

**PRIORITY CLAIM
UNDER 35 U.S.C.
§119 or 365**

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

This application claims priority under 35 U.S.C. §119 or 365 to the foreign/international application(s) identified below:

[] A certified copy of the priority document, [country] Application No. [], filed [], was previously filed in the parent application, U.S. Application No. [], filed [].

HAMILTON, BROOK, SMITH & REYNOLDS, P.C.

Concord, Massachusetts 01742-9133
Dated: June 4, 2004

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 2 年 6 月 2 7 日
Date of Application:

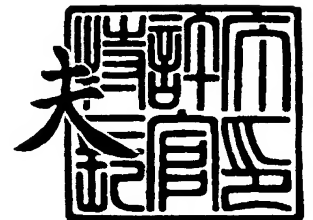
出 願 番 号 特 願 2 0 0 2 - 1 8 8 4 9 0
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 2 - 1 8 8 4 9 0]

出 願 人
Applicant(s): 株式会社ジェノックス創薬研究所
 国立成育医療センター総長

2 0 0 3 年 8 月 2 9 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 3 - 3 0 7 0 3 9 8

【書類名】 特許願

【整理番号】 G1-A0212

【提出日】 平成14年 6月27日

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区野川 907 帝京大学生物工学研究センター内 株式会社ジェノックス創薬研究所内

【氏名】 橋田 亮一

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区野川 907 帝京大学生物工学研究センター内 株式会社ジェノックス創薬研究所内

【氏名】 加賀谷 伸治

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区野川 907 帝京大学生物工学研究センター内 株式会社ジェノックス創薬研究所内

【氏名】 彌生 吉広

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区野川 907 帝京大学生物工学研究センター内 株式会社ジェノックス創薬研究所内

【氏名】 杉田 雄二

【発明者】

【住所又は居所】 東京都世田谷区太子堂 3-35-31 国立成育医療センター研究所内

【氏名】 斎藤 博久

【発明者】

【住所又は居所】 東京都中央区築地 5-1-1 国立がんセンター研究所内

【氏名】 大倉 永也

【特許出願人】

【識別番号】 597177471

【氏名又は名称】 株式会社ジェノックス創薬研究所

【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都世田谷区太子堂 3 - 3 5 - 3 1

【氏名又は名称】 国立成育医療センター

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【選任した代理人】

【識別番号】 100108774

【弁理士】

【氏名又は名称】 橋本 一憲

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 041092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アレルギー性疾患の検査方法、および治療のための薬剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 次の工程を含む、アレルギー性疾患の検査方法。

(a) 被検者の好酸球細胞における、NOR-1 受容体タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを測定する工程

(b) 健常者の好酸球細胞における前記遺伝子の発現レベルと比較する工程

【請求項 2】 遺伝子の発現レベルを、cDNAのPCRによって測定する、請求項 1 に記載の検査方法。

【請求項 3】 アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎である、請求項 1 または 2 に記載の検査方法。

【請求項 4】 NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖に相補的な塩基配列を有する少なくとも 15 塩基の長さを有するオリゴヌクレオチドからなる、アレルギー性疾患検査用試薬。

【請求項 5】 次の工程 (1) および (2) を含む、候補化合物が下記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法。

(1) 下記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドを発現する細胞に候補化合物を接触させる工程

(a) NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(b) NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アトピー性皮膚炎の寛解期に好酸球の減少に伴って好酸球において発現が増加するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(2) 前記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程、

【請求項 6】 細胞が株化白血球細胞である請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】 次の工程 (1) および (2) を含む、候補化合物が下記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する

方法。

(a) NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(b) NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アトピー性皮膚炎の寛解期に好酸球の減少に伴って好酸球において発現が増加するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(1) 被検動物に候補化合物を投与する工程、および

(2) 被検動物の好酸球細胞における前記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの発現強度を測定する工程、

【請求項 8】 請求項 5～7 のいずれかに記載の方法によって、前記発現レベルに与える影響を検出し、対照と比較して前記発現レベルを上昇させる化合物を選択する工程を含む、前記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを上昇させる化合物のスクリーニング方法。

【請求項 9】 次の工程 (1) および (2) を含む、候補化合物が NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法。

(1) NOR-1 受容体タンパク質をコードする遺伝子の転写調節領域と、レポーター遺伝子とが機能的に結合した構造を有する DNA を含む細胞または細胞抽出液と、候補化合物を接触させる工程、および

(2) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程、

【請求項 10】 請求項 9 に記載の方法によって、候補化合物の前記活性に与える影響を検出し、対照と比較して前記活性を上昇させる化合物を選択する工程を含む、NOR-1 受容体タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを上昇させる化合物のスクリーニング方法。

【請求項 11】 次の工程 (1)～(3) を含む、アレルギー性疾患治療薬のための候補化合物をスクリーニングする方法。

(1) NOR-1 受容体タンパク質と被験化合物を接触させる工程

(2) NOR-1 受容体タンパク質と被験化合物との結合活性を測定する工程

(3) NOR-1 受容体タンパク質と結合する化合物を選択する工程

【請求項 12】 次の工程 (1) ~ (4) を含む、アレルギー性疾患治療薬のための候補化合物をスクリーニングする方法。

(1) NOR-1 受容体タンパク質または該タンパク質のリガンド結合領域と転写調節領域結合タンパク質との融合タンパク質を発現し得る DNA、および該転写調節領域結合タンパク質の結合する DNA 配列の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合した構造を有する DNA、を導入した細胞を提供する工程

(2) 前記細胞と被検化合物を接触させる工程

(3) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程

(4) 前記活性を変化させる化合物を選択する工程

【請求項 13】 請求項 10 ~ 12 のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含有する、アレルギー性疾患治療薬。

【請求項 14】 請求項 10 ~ 12 のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができるシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンを有効成分として含有するアレルギー性疾患治療薬。

【請求項 15】 アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎である、請求項 13 または 14 に記載の治療薬。

【請求項 16】 下記の (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの好酸球細胞における発現強度を低下させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物からなるアレルギー性疾患モデル動物。

(a) NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

(b) NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アトピー性皮膚炎の寛解期に好酸球の減少に伴って好酸球において発現が増加するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 17】 トランスジェニック動物が、ノックアウト動物である請求項 16 に記載のモデル動物。

【請求項 18】 細胞における NOR-1 受容体タンパク質を活性化させることを特徴とする、細胞のアポトーシス誘導方法。

【請求項 1 9】 請求項 1 0 ～ 1 2 のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物またはシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンと、細胞を接触させる工程を含む、請求項 1 7 に記載のアポトーシス誘導方法。

【請求項 2 0】 請求項 1 0 ～ 1 2 のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物またはシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンを含む、アポトーシス誘導剤。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、アレルギー性疾患に関連する NOR - 1 遺伝子の発現を指標としたアレルギー性疾患の検査方法、およびアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法、並びにアレルギー性疾患の治療のための薬剤に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

アトピー性皮膚炎等のアレルギー性疾患は、多因子性の病気(multifactorial diseases)と考えられている。これらの病気は多くの異なる遺伝子の発現の相互作用によって起こり、これらの個々の遺伝子の発現は、複数の環境要因によって影響を受ける。このため、特定の病気を起こす特定の遺伝子を解明することは、非常に困難である。

【0 0 0 3】

またアレルギー性疾患には、変異や欠陥を有する遺伝子の発現や、特定の遺伝子の過剰発現や発現量の減少が関わっていると考えられている。病気に関して遺伝子発現が果たしている役割を解明するためには、遺伝子が発症にどのように関わり、薬剤などの外的な刺激が遺伝子発現をどのように変化させるのかを理解する必要がある。

【0 0 0 4】

近年の遺伝子発現の解析技術の発達により、多くの臨床試料で、遺伝子の発現を解析・比較することが可能となった。このような方法としては、ディファレン

シャルディスプレイ (DD) 法が有用である。ディファレンシャルディスプレイ法は、ライアンおよびパディー (Liang and Pardee) によって 1992 年に最初に開発された (Science, 1992, 257:967-971)。この方法を用いることによって、1 回に数十種類以上のサンプルをスクリーニングすることができ、それらのサンプル中で発現が変化した遺伝子を検出することが可能である。このような方法を用いて、変異が生じた遺伝子や、時間や環境とともに発現が変わるような遺伝子を調べることによって、病因遺伝子の解明のために重要な情報がもたらされることが期待される。これらの遺伝子には、環境要因によって発現に影響を受けるような遺伝子も含まれる。

【0 0 0 5】

さて、現在アレルギー性疾患の診断においては、一般に、問診、家族歴、そして本人の既往症の確認が重要な要素となっている。またアレルギーをより客観的な情報に基づいて診断するために、血液を試料とする試験方法や、アレルゲンに対する患者の免疫学的な応答を観察する方法も実施されている。前者の例として、アレルゲン特異的 IgE 測定、白血球ヒスタミン遊離試験、あるいはリンパ球幼若化試験等が挙げられる。アレルゲン特異的 IgE の存在は、そのアレルゲンに対するアレルギー反応の証明である。しかし患者によっては、必ずしもアレルゲン特異的な IgE を検出できるとは限らない場合もある。また、その測定原理上、診断に必要なアレルゲンの全てに対して、試験を実施しなければならない。白血球ヒスタミン遊離試験やリンパ球幼若化試験は、免疫システムのアレルゲンに対する反応を *in vitro* で観察する方法である。これらの方法は、操作が煩雑である。

【0 0 0 6】

一方、患者を実際にアレルゲンに接触させたときに観察される免疫応答をアレルギーの診断に役立てる方法（後者）も公知である。ブリック・テスト、スクラッチ・テスト、パッチ・テスト、皮内反応、あるいは誘発試験等が、この種の試験に含まれる。これらの試験では、患者のアレルギー反応を直接診断することができる反面、実際に被検者をアレルゲンに曝露する侵襲性の高い検査であると言える。

【0 0 0 7】

この他、アレルゲンにかかわらず、アレルギー反応の関与を証明するための試験方法も試みられている。例えば、血清IgE値が高値である場合、その患者にはアレルギー反応が起きていると推定することができる。血清IgE値は、アレルゲン特異IgEの総量に相当する情報である。アレルゲンの種類にかかわらずIgEの総量を決定することは容易であるが、非アトピー型気管支炎等の疾患を持つ患者では、IgEが低値となる場合がある。

【0008】

好酸球数とECP値は、I型アレルギーに引き続いて起きる遅延型反応や、アレルギー性炎症反応に関連する診断項目である。好酸球の数は、アレルギー症状の進展を反映するとされている。また、好酸球の顆粒に含まれるタンパク質であるECP(eosinophil cationic protein)も、喘息患者の発作に伴って強く活性化される。これらの診断項目は、確かにアレルギー症状を反映するものではある。しかし、実際に診断の指標とできる範囲は限られている。

【0009】

従って、アレルゲンにかかわらず、アレルギー患者の病態の把握や治療方針の決定に役立てることができる診断指標が求められていた。患者に対する危険が少なく、しかも診断に必要な情報を容易に得ることができるアレルギー性疾患のマーカーは非常に有用である。アレルギー性疾患に関連する遺伝子を同定することができれば、該遺伝子の発現を指標とすることにより、アレルギー性疾患の検査が可能となる。さらに、該タンパク質の細胞における機能が解明すれば、その機能に関する知見を基に、アレルギー性疾患の治療方法、および治療のための薬剤の開発が進むものと期待される。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、アレルギー性疾患に関連する遺伝子を同定することにある。さらに、本発明は、該遺伝子の発現を指標としたアレルギー性疾患の検査方法、およびアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法、並びにアレルギー性疾患の治療のための薬剤を提供することを目的とする。

【 0 0 1 1 】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、既に確立された「蛍光DD(Fluorescent DD)法」(T.Itoら, 1994, FEBS Lett. 351: 231-236)の手順に基づき、複数のヒトの血液から調製した白血球細胞RNAサンプルを解析できるDDシステムを開発した(特願平11-120489)。そして該システムを利用して、アレルギー性疾患特異的に発現量が異なる遺伝子の同定を試みた。

【 0 0 1 2 】

すなわち、まず本発明者らは、代表的なアレルギー性疾患であるアトピー性皮膚炎の患者について、皮膚炎症状の増悪期と寛解期とでアレルギー症状に関連するいくつかのパラメーターを比較した。その結果、一部の患者で寛解期における好酸球の減少が観察された。一般に好酸球は、アトピー性皮膚炎の代表的な臨床指標とされていることから、本発明者らはこの知見に着目した。そして、同一患者の増悪期と寛解期の間で、好酸球において発現レベルが変化する遺伝子を単離することができれば、アトピー性皮膚炎に直接的に関与する遺伝子の単離が可能となるものと考えた。

【 0 0 1 3 】

そこで、複数の被検者について、アトピー性皮膚炎の増悪期と寛解期に好酸球を採取して、前記システムを利用して好酸球で発現量が変化する遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、寛解期に好酸球の減少が観察された患者において有意に高い発現量を示す配列「2250-01」の単離に成功した。ゲノムデータベース解析の結果、NOR-1(MINOR)と呼ばれる核内オーファン受容体のイントロン部分であることが分かった。そこで、NOR-1(MINOR)の報告されているエクソン配列について発現測定を行ったところ、イントロン部分で測定したときの結果と同様に、好酸球減少の見られた著効例の寛解期に誘導されるという傾向が見られた。NOR-1遺伝子はこれまでのところ、アレルギー性疾患との関連については報告されていない。

【 0 0 1 4 】

アトピー性皮膚炎の治療による寛解期に末梢血好酸球で、アポトーティックな

性格が示唆されるような遺伝子の亢進が見られるのは、末梢血好酸球数の減少とよく対応しており、NOR-1遺伝子の発現誘導は治療効果と相関する可能性が高いものと考えられる。

本発明のNOR-1遺伝子の発現量を指標とすることにより、アレルギー性疾患を検査することが可能である。

【0015】

また、NOR-1受容体はオーファン受容体であり生体内リガンドや活性化物質はこれまでのところ見つかっていなかった。本発明者らは、リガンドの探索のためのハイスループット系を開発し、この系を使用することによりNOR-1の転写活性化作用を有すると考えられる化合物の取得に成功した。該化合物はシクロペンテン構造を持つプロスタグランジンであり、NOR-1受容体の生体内リガンドである可能性が考えられた。即ち本発明者らは、アレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニングを行うことが可能であることを見出した。NOR-1遺伝子の発現を誘導する化合物、あるいはNOR-1受容体と結合し、転写活性を促進する化合物は、アレルギー性疾患に対する治療効果が期待される。

【0016】

本発明は、アレルギー性疾患時、特に好酸球の減少を伴う寛解期において高い発現を示すNOR-1遺伝子の発現を指標としたアレルギー性疾患の検査方法、およびアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法、並びにアレルギー性疾患の治療のための薬剤に関し、より具体的には、

〔1〕 次の工程を含む、アレルギー性疾患の検査方法、

（a）被検者の好酸球細胞における、NOR-1受容体タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを測定する工程

（b）健常者の好酸球細胞における前記遺伝子の発現レベルと比較する工程

〔2〕 遺伝子の発現レベルを、cDNAのPCRによって測定する、〔1〕に記載の検査方法、

〔3〕 アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎である、〔1〕または〔2〕に記載の検査方法、

〔4〕 NOR-1受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはその

相補鎖に相補的な塩基配列を有する少なくとも 15 塩基の長さを有するオリゴヌクレオチドからなる、アレルギー性疾患検査用試薬、

〔5〕 次の工程（１）および（２）を含む、候補化合物が下記（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法、

（１）下記（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドを発現する細胞に候補化合物を接触させる工程

（a）NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

（b）NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アトピー性皮膚炎の寛解期に好酸球の減少に伴って好酸球において発現が増加するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

（２）前記（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程、

〔6〕 細胞が株化白血球細胞である〔5〕に記載の方法、

〔7〕 次の工程（１）および（２）を含む、候補化合物が下記（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法、

（a）NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド

（b）NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アトピー性皮膚炎の寛解期に好酸球の減少に伴って好酸球において発現が増加するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

（１）被検動物に候補化合物を投与する工程、および

（２）被検動物の好酸球細胞における前記（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドの発現強度を測定する工程、

〔8〕 〔5〕～〔7〕のいずれかに記載の方法によって、前記発現レベルに与える影響を検出し、対照と比較して前記発現レベルを上昇させる化合物を選択する工程を含む、前記（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを上昇させる化合物のスクリーニング方法、

〔9〕 次の工程（１）および（２）を含む、候補化合物がNOR-1 受容体タ

ンパク質をコードするポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法、

(1) NOR-1 受容体タンパク質をコードする遺伝子の転写調節領域と、レポーター遺伝子とが機能的に結合した構造を有する DNA を含む細胞または細胞抽出液と、候補化合物を接触させる工程、および

(2) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程、

[10] [9] に記載の方法によって、候補化合物の前記活性に与える影響を検出し、対照と比較して前記活性を上昇させる化合物を選択する工程を含む、NOR-1 受容体タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを上昇させる化合物のスクリーニング方法、

[11] 次の工程 (1) ~ (3) を含む、アレルギー性疾患治療薬のための候補化合物をスクリーニングする方法、

(1) NOR-1 受容体タンパク質と被験化合物を接触させる工程

(2) NOR-1 受容体タンパク質と被験化合物との結合活性を測定する工程

(3) NOR-1 受容体タンパク質と結合する化合物を選択する工程

[12] 次の工程 (1) ~ (4) を含む、アレルギー性疾患治療薬のための候補化合物をスクリーニングする方法、

(1) NOR-1 受容体タンパク質または該タンパク質のリガンド結合領域と転写調節領域結合タンパク質との融合タンパク質を発現し得る DNA、および該転写調節領域結合タンパク質の結合する DNA 配列の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合した構造を有する DNA、を導入した細胞を提供する工程

(2) 前記細胞と被検化合物を接触させる工程

(3) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程

(4) 前記活性を変化させる化合物を選択する工程

[13] [10] ~ [12] のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含有する、アレルギー性疾患治療薬、

[14] [10] ~ [12] のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができるシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンを有効成分として含有するアレルギー性疾患治療薬、

〔15〕 アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎である、〔13〕または〔14〕に記載の治療薬、

〔16〕 下記の（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドの好酸球細胞における発現強度を低下させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物からなるアレルギー性疾患モデル動物、

（a）NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド

（b）NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アトピー性皮膚炎の寛解期に好酸球の減少に伴って好酸球において発現が増加するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

〔17〕 トランスジェニック動物が、ノックアウト動物である〔16〕に記載のモデル動物、

〔18〕 細胞におけるNOR-1 受容体タンパク質を活性化させることを特徴とする、細胞のアポトーシス誘導方法、

〔19〕 〔10〕～〔12〕のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物またはシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンと、細胞を接触させる工程を含む、〔17〕に記載のアポトーシス誘導方法、

〔20〕 〔10〕～〔12〕のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物またはシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンを含む、アポトーシス誘導剤、を提供するものである。

【0017】

【発明の実施の形態】

本発明者らは、NOR-1(MINOR)遺伝子（本明細書においては、単に「NOR-1」と記載する場合あり）が、アトピー性皮膚炎の患者の増悪期と寛解期との比較において、好酸球の減少を伴った寛解期にある患者の好酸球で発現量が増加することを見出した。従って、NOR-1遺伝子の発現レベルを指標することにより、被検者に対してアレルギー性疾患の検査を行うことができる。

【0018】

本発明は、NOR-1遺伝子の発現レベルを測定することを特徴とする、アレルギー

一性疾患の検査方法を提供する。

【0019】

本発明の方法の好ましい態様においては、次の工程を含む。

(a) 被検者の好酸球細胞における、NOR-1受容体タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを測定する工程

(b) 健常者の好酸球細胞における前記遺伝子の発現レベルと比較する工程

NOR-1(MINOR)受容体は、表1に示すような種々の呼び名を持った3つのサブファミリーを構成する核内オーファン受容体の γ タイプであり、種を超えて主としてNOR-1と呼ばれている。

【0020】

【表1】

	ヒト	マウス	ラット
α	NAK-1(TR3)	nur77	NGFI-B
β	TINUR/NOT	Nurr1	RNR-1
γ	MINOR / CHN	TEC	NOR-1

【0021】

これらNOR-1(MINOR)受容体タンパク質のアミノ酸配列、または該タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列に関する情報は、当業者においては公知の各種遺伝子データベース等から容易に取得することができる。具体的には、ヒトNOR-1受容体タンパク質をコードする遺伝子(NOR-1遺伝子)の塩基配列を配列番号：1に、NOR-1受容体タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：2に示す。

【0022】

本発明において、アレルギー性疾患(allergic disease)とはアレルギー反応の関与する疾患の総称である。より具体的には、アレルゲンが同定され、アレルゲンへの曝露と病変の発症に深い結びつきが証明され、その病変に免疫学的な機序が証明されることと定義することができる。ここで、免疫学的な機序とは、アレルゲンの刺激によって白血球細胞が免疫応答を示すことを意味する。アレルゲンとしては、ダニ抗原や花粉抗原等を例示することができる。

【0023】

代表的なアレルギー性疾患には、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、花粉症、あるいは昆虫アレルギー等を示すことができる。アレルギー素因(allergic diathesis)とは、アレルギー性疾患を持つ親から子に伝えられる遺伝的な因子である。家族性に発症するアレルギー性疾患はアトピー性疾患とも呼ばれ、その原因となる遺伝的に伝えられる因子がアトピー素因である。アトピー性皮膚炎は、アトピー性疾患のうち、特に皮膚炎症状を伴う疾患に対して与えられた総称である。

【0024】

本発明におけるアレルギー性疾患の検査とは、以下のような検査が含まれる。例えば、被検者がアレルギー性疾患を罹患しているか否かの検査、アレルギー性疾患を被り易い体質か否かの検査、またはアレルギー症状が改善に向かっているかどうかを判断するための検査等が挙げられる。本発明のNOR-1遺伝子は、特に好酸球の減少を伴った寛解期にあるアトピー性皮膚炎患者の好酸球で発現量の増加を示した。好酸球はアトピー性皮膚炎の代表的な臨床マーカーであることから、その減少と関連する臨床マーカーは、治療効果の判定に有用である。より具体的には、NOR-1遺伝子の発現の上昇は、好酸球の減少を伴ってアレルギー性疾患の改善が進んでいることを示している。

【0025】

アトピー性皮膚炎の重症度と好酸球数は相関しており、好酸球数を積極的に減らすことは治療につながる可能性がある。数の減少に伴って好酸球に特異的に誘導されてくるこの遺伝子を測定するとともに、細胞の外から積極的に誘導するような方法や物質を見つけ出せば、アトピー性皮膚炎の新しい治療法及びそれを評価するための診断法につながる可能性がある。

【0026】

本発明において、NOR-1遺伝子の発現レベルとは、該遺伝子のmRNAへの転写、並びにタンパク質への翻訳を含む。従って、本発明によるアレルギー性疾患の検査方法は、該遺伝子に対応するmRNAの発現強度、あるいは該遺伝子によってコードされるタンパク質の発現レベルの比較に基づいて行われる。

【0027】

本発明のアレルギー性疾患の検査方法におけるNOR-1遺伝子の発現レベルの測定は、当業者においては、公知の遺伝子解析方法に従って実施することができる。具体的には、例えばNOR-1遺伝子にハイブリダイズする核酸をプローブとしたハイブリダイゼーション技術、または本発明の遺伝子にハイブリダイズするDNAをプライマーとした遺伝子増幅技術等を利用することができる。

【0028】

本発明のアレルギー性疾患検査用試薬として用いられるプローブまたはプライマーとしては、配列番号：1に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な少なくとも15ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを挙げることができる。ここで「相補鎖」とは、A:T (RNAの場合はU)、G:Cの塩基対からなる2本鎖DNAの一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも15個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%、より好ましくは90%、さらに好ましくは95%以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。塩基配列の相同性は、BLASTN等のアルゴリズムにより決定することができる。

【0029】

このようなポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のポリヌクレオチドを増幅するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15bp～100bp、好ましくは15bp～35bpの鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明のポリヌクレオチドの少なくとも一部若しくは全部の配列を有し、少なくとも15bpの鎖長のDNAが用いられる。プライマーとして用いる場合、3'側の領域は相補的である必要があるが、5'側には制限酵素認識配列やタグなどを付加することができる。

【0030】

なお、本発明における「ポリヌクレオチド」は、DNAあるいはRNAであることができる。これらポリヌクレオチドは、合成（単離）されたものでも天然のものでもよい。また、ハイブリダイゼーションに用いるプローブDNAは、通常、標識したものが用いられる。標識方法としては、例えば次のような方法を示すことがで

きる。なお用語オリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチドのうち、重合度が比較的低いものを意味している。オリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチドに含まれる。

- ・ DNAポリメラーゼIを用いるニックトランスレーションによる標識
- ・ ポリヌクレオチドキナーゼを用いる末端標識
- ・ クレノーフラグメントによるフィルイン末端標識 (Berger SL, Kimmel AR. (1987) Guide to Molecular Cloning Techniques, Method in Enzymology, Academic Press; Hames BD, Higgins SJ (1985) Genes Probes: A Practical Approach. IRL Press; Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press)
- ・ RNAポリメラーゼを用いる転写による標識 (Melton DA, Krieg, PA, Rebagliati MR, Maniatis T, Zinn K, Green MR. (1984) Nucleic Acid Res., 12, 7035-7056)
- ・ 放射性同位体を用いない修飾ヌクレオチドをDNAに取り込ませる方法 (Kricka LJ. (1992) Nonisotopic DNA Probing Techniques. Academic Press)

【0031】

ハイブリダイゼーション技術を利用したアレルギー性疾患の検査は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション法、ドットブロット法、DNAマイクロアレイを用いた方法などを使用して行うことができる。さらには、RT-PCR法等の遺伝子増幅技術を利用することができる。RT-PCR法においては、遺伝子の増幅過程においてPCR増幅モニター法を用いることにより、本発明の遺伝子の発現について、より定量的な解析を行うことが可能である。

【0032】

PCR遺伝子増幅モニター法においては、両端に互いの蛍光を打ち消し合う異なった蛍光色素で標識したプローブを用い、検出対象 (DNAもしくはRNAの逆転写産物) にハイブリダイズさせる。PCR反応が進んでTaqポリメラーゼの 5'-3' エクソヌクレアーゼ (exonuclease) 活性により同プローブが分解されると二つの蛍光色素が離れ、蛍光が検出されるようになる。この蛍光の検出をリアルタイムに行う。検出対象についてコピー数の明らかな標準試料について同時に測定するこ

とにより、PCR増幅の直線性のあるサイクル数で目的試料中の検出対象のコピー数を決定する (Holland, P.M. et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7276-7280; Livak, K. J. et al., 1995, PCR Methods and Applications 4(6): 357-362; Heid, C. A. et al., Genome Research 6:986-994; Gibson, E. M. U. et al., 1996, Genome Research 6:995-1001)。PCR増幅モニター法においては、例えば、ABI PRISM7700 (PEバイオシステムズ社) を用いることができる。

【 0 0 3 3 】

また本発明のアレルギー性疾患の検査方法は、NOR-1遺伝子によりコードされるタンパク質を検出することにより行うこともできる。このような検査方法としては、例えば、該遺伝子によってコードされるタンパク質に結合する抗体を利用したウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、ELISA法などを利用することができる。

【 0 0 3 4 】

この検出に用いるNOR-1タンパク質に結合する抗体は、当業者に周知の技法を用いて得ることができる。本発明に用いる抗体は、ポリクローナル抗体、あるいはモノクローナル抗体 (Milstein C, et al., 1983, Nature 305(5934): 537-40) であることができる。例えば、本発明のタンパク質に対するポリクローナル抗体は、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出し、この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用することができる。あるいは必要に応じてこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離することもできる。また、モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物から免疫細胞を取り出して骨髓腫細胞などと細胞融合させる。こうして得られたハイブリドーマをクローニングして、その培養物から抗体を回収しモノクローナル抗体とすることができる。

【 0 0 3 5 】

NOR-1タンパク質の検出には、これらの抗体を適宜標識して用いればよい。また、この抗体を標識せずに、該抗体に特異的に結合する物質、例えば、プロテインAやプロテインGを標識して間接的に検出することもできる。具体的な検出方法としては、例えば、ELISA法を挙げることができる。

【0036】

抗原に用いるタンパク質もしくはその部分ペプチドは、例えばNOR-1遺伝子もしくはその一部を発現ベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入して、形質転換体を作成し、該形質転換体を培養して組み換えタンパク質を発現させ、発現させた組み換えタンパク質を培養体または培養上清から精製することにより得ることができる。あるいは、NOR-1遺伝子によってコードされるアミノ酸配列の部分アミノ酸配列からなるオリゴペプチドを化学的に合成し、免疫原として用いることもできる。

【0037】

本発明においては、被検者の好酸球細胞を試料とすることが好ましい。好酸球細胞は、末梢血から公知の方法によって調製することができる。すなわち、例えばヘパリン採血した血液を遠心分離によって分画し、白血球細胞を分離する。次に白血球細胞から、フィコールによる遠心分離等によって顆粒球細胞を分取し、更にCD16抗体を用いた好中球のディプリーション等によって好酸球細胞を分離することができる。分離された好酸球を破壊してライセートとすれば、前記タンパク質の免疫学的な測定のための試料とすることができる。あるいはこのライセートからmRNAを抽出すれば、前記遺伝子に対応するmRNAの測定のための試料とすることができる。好酸球のライセートやmRNAの抽出には、市販のキットを利用すると便利である。

【0038】

あるいは、好酸球の分離を行わず、全血や、末梢血白血球集団を対象として、本発明において指標とすべき遺伝子の発現レベルを測定しても良い。この場合には、測定値の補正を行うことによって、細胞における遺伝子の発現レベルの変化を求めることができる。例えば好酸球に特異的に発現し、かつ細胞の状態にかかわらず発現レベルが大きく変動しない遺伝子（ハウスキーピング遺伝子）の発現レベルの測定値に基づいて、本発明において指標とすべき遺伝子の発現レベルの測定値を補正することができる。

【0039】

また検出すべきタンパク質が分泌型のタンパク質である場合には、被検者の血

液や血清などの体液試料に含まれる目的とするタンパク質の量を測定することによって、それをコードする遺伝子の発現レベルの比較が可能である。

【0040】

本発明によるアレルギー性疾患の検査の結果、特にアトピー性皮膚炎等のアレルギー性疾患の患者において本発明の遺伝子の発現レベルが上昇している場合に、好酸球の減少を伴ってアレルギー症状の改善が進んでいるものと推定される。

【0041】

また本発明は、下記の（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドの好酸球細胞における発現レベルを低下させたトランスジェニック非ヒト動物からなるアレルギー性疾患モデル動物に関する。

（a）NOR-1受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

（b）NOR-1受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アトピー性皮膚炎の寛解期に好酸球の減少に伴って好酸球において発現が増加するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

【0042】

本発明において、発現レベルの低下とは、遺伝子の機能を実質的に消失させたノックアウト状態が含まれる。本発明において、遺伝子の機能が実質的に消失した状態とは、遺伝子の発現や、この遺伝子によってコードされるタンパク質の活性を見出すことができない状態を言う。遺伝子の発現レベルは、例えば実施例に示すような定量的なPCRにより確認することができる。また翻訳産物であるタンパク質の活性が実質的に見出せないことは、正常な状態と比較することにより確認することができる。

【0043】

このようなトランスジェニック動物には、例えば遺伝子のコード領域に変異を導入し、人為的にアミノ酸配列の変異や終止コドンを生じさせて、本来のタンパク質の活性を発現できない状態とした動物などを示すことができる。アミノ酸配列の変異には、置換、欠失、挿入、あるいは付加を示すことができる。その他、遺伝子の転写調節領域を変異させることにより、本発明の遺伝子の発現そのもの

を調節することもできる。

【0044】

特定の遺伝子を対象として、トランスジェニック動物を得る方法は公知である。すなわち、遺伝子と卵を混合してリン酸カルシウムで処理する方法や、位相差顕微鏡下で前核期卵の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法（マイクロインジェクション法、米国特許第4873191号）、胚性幹細胞（ES細胞）を使用する方法などによってトランスジェニック動物を得ることができる。その他、レトロウィルスベクターに遺伝子を挿入し、卵に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵に導入する精子ベクター法等も開発されている。精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である（M. Lavitrano et al. Cell, 57, 717, 1989）。

【0045】

本発明のトランスジェニック動物は、ヒト以外のあらゆる脊椎動物を利用して作成することができる。具体的には、マウス、ラット、ウサギ、ミニブタ、ヤギ、ヒツジ、あるいはウシ等の脊椎動物において様々な遺伝子の導入や発現レベルを改変されたトランスジェニック動物が作り出されている。

【0046】

本発明のトランスジェニック動物には、例えば、配列番号：1に示す塩基配列からなるヒトNOR-1遺伝子の非ヒト動物種におけるホモログの発現が抑止されたノックアウト動物が含まれる。ノックアウト動物の表現型を観察することにより、ノックアウトした遺伝子の働きを具体的に知ることができる。配列番号：1に示す塩基配列からなるNOR-1遺伝子は、ヒトにおいてアトピー皮膚炎の好酸球の減少を伴った寛解期における好酸球中で発現が上昇していた。従って、そのホモログをノックアウトした動物は、アレルギー性疾患のモデル動物として有用である。

【0047】

例えば、本発明によるノックアウト動物が皮膚炎を発症したり、何らかのアレルギー性疾患に関連した測定値の変化を示せば、それを回復させる作用を持った

化合物を探索するスクリーニングシステムが構築できる。

【0048】

ノックアウト動物の作製方法は公知である。例えばマウスにおいて、胚性幹細胞を用いて相同組換えを行い、一方の対立遺伝子を改変・破壊した胚性幹細胞を選別し、ノックアウト動物を作製する方法が公知である。例えば、受精卵に遺伝子を操作した胚性幹細胞を注入して、胚性幹細胞由来の細胞と胚由来の細胞が混ざったキメラ動物を得る。このキメラ動物（キメラとは、2個以上の受精卵に基づいた体細胞で形成される単一個体をいう）と正常マウスを交配すると、一方の対立遺伝子の全てが改変・破壊されたヘテロ接合体を作製することができる。さらに、ヘテロ接合体同士を交配すれば、ホモ接合体が作製できる。本発明によるトランスジェニック動物は、これらヘテロ接合体と、ホモ接合体のいずれをも含む。

【0049】

相同組換えとは、遺伝子組換え機構で塩基配列が同じ、または非常に類似している2つの遺伝子間で起こる組換えのことをいう。相同組換えを起こした細胞の選別にはPCRを使用することができる。挿入遺伝子の一部と挿入が期待される領域の一部をプライマーとして使ったPCR反応を行い、増幅産物ができた細胞で相同組換えを起こしていることが判明する。また、胚幹細胞で発現している遺伝子に相同組み換えを起こさせる場合には、導入遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を結合させておき、導入後に細胞をネオマイシン耐性にさせることにより選択することができる等、公知の方法およびそれらの変法を用いて容易に選択することができる。

【0050】

本発明によるトランスジェニック動物は、後に述べるアレルギー性疾患の治療または予防のための医薬品のスクリーニングに加えて、アレルギー性疾患のメカニズムの解明、さらにはスクリーニングされた化合物の安全性の試験に有用である。

【0051】

本発明によって、NOR-1遺伝子の発現レベルが好酸球の減少を伴う寛解期にあ

るアトピー性皮膚炎患者の好酸球において、上昇することが明らかとなった。従って、好酸球細胞においてNOR-1遺伝子、または該遺伝子と機能的に同等な遺伝子の発現レベルを人為的に低下させた動物は、アレルギー性疾患のモデル動物として利用することができる。なお好酸球における発現レベルの低下とは、白血球集団全体における前記遺伝子の発現レベルの低下を含む。すなわち、前記遺伝子の発現レベルを低下させるのは好酸球のみである場合のみならず、白血球集団全体において前記遺伝子の発現レベルが低下している場合を含む。本発明において機能的に同等な遺伝子とは、前記（a）または（b）に記載した遺伝子のいずれかを意味する。本発明におけるモデル動物には、例えば前記トランスジェニック動物等を利用することができる。

【0052】

更に本発明は、候補化合物が本発明のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法を提供する。本発明において、NOR-1遺伝子は、好酸球の減少を伴う寛解期にあるアトピー性皮膚炎患者の好酸球において有意に発現レベルが上昇している。従って、これらの遺伝子の発現レベルに与える影響を検出する方法に基づいて、その発現レベルを上昇させることができる化合物を選択することによって、アレルギー性疾患の治療薬を得ることができる。本発明において遺伝子の発現レベルを上昇させる化合物とは、遺伝子の転写、翻訳、タンパク質の活性発現のいずれかのステップを誘導する作用を持つ化合物である。本発明はさらに、NOR-1遺伝子の発現レベルに加えて、NOR-1遺伝子産物タンパク質の活性（転写活性化能）を検出する方法を提供するとともに、NOR-1遺伝子産物タンパク質の活性（転写活性化能）を上昇させる化合物を選択することによって、アレルギーの治療薬を得ることができる。

【0053】

候補化合物が本発明のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響の検出方法は、in vivoで行うこともin vitroで行うこともできる。in vivoでの影響を検出するには、適当な被検動物を利用する。被検動物には、例えばアレルギー性疾患モデル動物や、前記（a）または（b）に記載の遺伝子の好酸球細胞における発現が抑制されたトランスジェニック非ヒト動物からなるアレルギー性疾患モデル

動物を利用することができる。本発明に基づく *in vivo*での発現レベルに与える影響の検出は、例えば以下のような工程に従って実施することができる。

- (1) 被検動物に候補化合物を投与する工程、
- (2) 被検動物の好酸球細胞における前記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程、

【0054】

本発明の検出方法における被検動物としては、例えば、NOR-1遺伝子のアンチセンスを発現させることによりNOR-1遺伝子の発現を低下させたトランスジェニック動物を利用することができる。このようなトランスジェニック動物は、例えば以下のようにして作成することができる。すなわち、まずNOR-1遺伝子の配列の全長配列もしくは部分配列を、適当なプロモーター配列の下流に逆向きの方向で組み込み、アンチセンスRNA発現ベクターを構築する。この発現ベクターを核へ導入すれば、NOR-1遺伝子のアンチセンスを発現し、NOR-1遺伝子の発現が低下したトランスジェニック動物を得ることができる。発現ベクターに使用するプロモーターとして、適当な薬剤等の物質により転写が調節されるプロモーターを用いれば、該物質の投与によってトランスジェニック動物におけるNOR-1遺伝子の発現レベルを調整することができる。

【0055】

このようにしてNOR-1遺伝子の発現を低下させたモデル動物に薬剤候補化合物を投与し、モデル動物の好酸球におけるNOR-1遺伝子の発現に対する化合物の作用をモニターすることにより、NOR-1遺伝子の発現レベルに与える薬剤候補化合物の影響を検出することができる。

【0056】

本発明のスクリーニング方法により、NOR-1遺伝子の発現に様々な形で関与する薬剤を選択することができる。具体的には、例えば次のような作用点を持つ薬剤候補化合物を見出すことができる。

- ・ NOR-1遺伝子の発現をもたらすシグナル伝達経路の活性化
- ・ NOR-1遺伝子の転写活性の上昇
- ・ NOR-1遺伝子の転写産物の安定化もしくは分解の阻害、等

【0057】

また、*in vitro*においては、例えば、前記（a）または（b）に記載した遺伝子を発現する細胞に候補化合物を接触させ、前記遺伝子の発現レベルを検出する方法を利用することができる。具体的には、例えば以下のような工程に従って実施することができる。

（1）前記（a）または（b）に記載したポリヌクレオチドを発現する細胞に候補化合物を接触させる工程

（2）前記（a）または（b）に記載したポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程、

【0058】

本発明において、工程（1）に用いるための細胞は、これらポリヌクレオチドを適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な宿主細胞に導入することにより得ることができる。利用できるベクター、および宿主細胞は、本発明の遺伝子を発現し得るものであればよい。宿主-ベクター系における宿主細胞としては、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等が例示でき、それぞれ利用できるベクターを適宜選択することができる。

【0059】

ベクターの宿主への導入方法としては、生物学的方法、物理的方法、化学的方法などを示すことができる。生物学的方法としては、例えば、ウイルスベクターを使用する方法、特異的受容体を利用する方法、細胞融合法（HVJ（センダイウイルス）、ポリエチレングリコール（PEG）、電気的細胞融合法、微少核融合法（染色体移入））が挙げられる。また、物理的方法としては、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、ジーンパーティクルガン（gene gun）を用いる方法が挙げられる。化学的方法としては、リン酸カルシウム沈殿法、リポソーム法、DEAEデキストラン法、プロトプラスト法、赤血球ゴースト法、赤血球膜ゴースト法、マイクロカプセル法が挙げられる。

【0060】

本発明の検出方法においては、前記（a）または（b）に記載したポリヌクレオチドを発現する細胞として、株化白血球細胞を用いることもできる。株化白血

球細胞としては、Eol、YY-1、HL-60、TF-1、および AML14.3D10など白血球由来の株化細胞を例示できる。白血球細胞株の中でも、好酸球に由来する細胞株は、本発明の検出方法に好適である。好酸球に由来する細胞株としては、例えば、Eol、YY-1、AML14.3D10等を挙げることができる。

【 0 0 6 1 】

Eol(Eol-1: Saito H et al, Establishment and characterization of a new human eosinophilic leukemia cell line. Blood 66, 1233-1240, 1985)は、林原研究所より入手することができる。同様にYY-1(Ogata N et al, The activation of the JAK2/STAT5 pathway is commonly involved in signaling through the human IL-5 receptor. Int.Arch. Allergy Immunol., Suppl 1, 24-27, 1997)は、サイトシグナル研究所より分与される。またAML14.3D10(Baumann MA et al, The AML14 and AML14.3D10 cell lines: a long-overdue model for the study of eosinophils and more. Stem Cells, 16, 16-24, 1998)は、米国オハイオ州、Research Service, VA Medical Center DaytonのPaul CCより、商業的に入手可能である。

【 0 0 6 2 】

その他、未分化白血球細胞株であるHL-60クローン15(ATCC CRL-1964)は、酪酸存在下で1週間程度培養すれば、好酸球に分化し好酸球細胞株とすることができる。好酸球であることは、形態的に、多形核で好酸球顆粒が認められることにより判別することができる。形態的な観察は、ギムザ染色やディフクイック染色によって行われる。一般に、好酸球を含むヒト白血球細胞株は、白血病の患者サンプルから不死化した細胞をクローニングすることにより樹立することができる。従って、当業者は、必要に応じて好酸球細胞株を公知の方法によって得ることができる。このスクリーニング方法においては、まず前記株化白血球細胞に候補化合物を添加する。その後、該株化白血球細胞における前記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定し、該遺伝子の発現レベルを上昇させる化合物を選択する。

【 0 0 6 3 】

in vitroにおける検出方法のための細胞として、前記 (a) または (b) に記

載したポリヌクレオチドの発現を調節した形質転換細胞を用いることができる。このような形質転換細胞としては、例えば当該ポリヌクレオチドのアンチセンス発現ベクターを形質転換した細胞を挙げることができる。アンチセンス発現ベクターによる形質転換細胞は、前記トランスジェニック動物の作成と同様の原理によって得ることができる。得られた形質転換細胞を用いて該遺伝子の発現レベルに与える候補化合物の影響を検出することもできる。

【 0 0 6 4 】

なお本発明の方法において、前記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの発現レベルは、これらの遺伝子がコードするタンパク質の発現レベルのみならず、対応する mRNA を検出することにより比較することもできる。mRNA によって発現レベルの比較を行うには、タンパク質試料の調製工程に代えて、先に述べたような mRNA 試料の調製工程を実施する。mRNA やタンパク質の検出は、先に述べたような公知の方法によって実施することができる。

【 0 0 6 5 】

さらに NOR-1 遺伝子の転写調節領域を取得し、レポーターアッセイ系を構築することができる。レポーターアッセイ系とは、転写調節領域の下流にこの転写調節領域の制御下に発現するレポーター遺伝子の発現量を指標として、該転写調節領域に作用する転写調節因子をスクリーニングするアッセイ系をいう。

【 0 0 6 6 】

転写調節領域としては、プロモーター、エンハンサー、さらには、通常プロモーター領域に見られる CAAT ボックス、TATA ボックス等を例示することができる。またレポーター遺伝子として、CAT (chloramphenicol acetyltransferase) 遺伝子、ルシフェラーゼ (luciferase) 遺伝子、成長ホルモン遺伝子等を利用することができる。

【 0 0 6 7 】

NOR-1 遺伝子の転写調節領域は、当業者においては、一般的な方法、例えば、以下の方法により取得することができる。まず、配列番号：1 に記載された塩基配列に基づいて、BAC ライブラリー、YAC ライブラリー等のヒトゲノム DNA ライブラリーから、PCR またはハイブリダイゼーションを用いる方法によりスクリーニ

ングを行い、該cDNAの配列を含むゲノムDNAクローンを得る。得られたゲノムDNAの配列を基に、NOR-1遺伝子の転写調節領域を推定し、該転写調節領域を取得する。得られた転写調節領域を、レポーター遺伝子上流に位置するようにクローニングしてレポーターコンストラクトを構築する。得られたレポーターコンストラクトを培養細胞株に導入してスクリーニング用の形質転換体とする。この形質転換体に候補化合物を接触させ、レポーター遺伝子の発現を検出することによって、転写調節領域に対する候補化合物の作用を評価することができる。

【0068】

本発明の前記ポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法に基づいて、前記ポリヌクレオチドの発現レベルを変化させる化合物のスクリーニングを行うことができる。本発明は、次の工程を含む前記（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを変化させる化合物のスクリーニング方法に関する。

【0069】

すなわち本発明は、in vivoおよび／またはin vitroにおいて、候補化合物による前記ポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出し、対照と比較して前記発現レベルを上昇させる化合物を選択する工程を含む、前記（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを上昇させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

【0070】

あるいは本発明は、NOR-1遺伝子の転写調節領域を利用するレポーターアッセイによる、転写調節領域に作用する化合物のスクリーニング方法に関する。本発明によるレポーターアッセイの結果に基づいて、対象と比較してレポーター遺伝子の発現を上昇させる化合物を選択することにより、NOR-1遺伝子の発現を誘導する化合物を取得することができる。あるいは、リガンド結合領域に結合するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法に関する。

【0071】

本発明らによってアレルギー性疾患に関連するタンパク質として見出されたNOR-1(MINOR)受容体タンパク質は、オーファン受容体であり生体内リガンド活性物

質はこれまでのところ見つかっていない。NOR-1タンパク質のリガンド活性物質は、好酸球細胞内でダイレクトにNOR-1を活性化し、アポトーシスを促進させるものと考えられる。従って、NOR-1受容体のリガンド活性物質はアレルギー性疾患治療薬となるものと期待される。通常、受容体タンパク質と結合し得る化合物の探索を行うことにより、該受容体のリガンドを取得することが可能である。

【0072】

本発明は、NOR-1タンパク質と結合し得る化合物を選択することを特徴とする、アレルギー性疾患治療薬のための候補化合物のスクリーニング方法を提供する。本方法においては、NOR-1受容体タンパク質と被験化合物を接触させ、次いで、NOR-1受容体タンパク質と被験化合物との結合活性を測定し、NOR-1受容体タンパク質と結合する化合物を選択する。また、単に結合をするのみでなく、NOR-1の転写活性を測定し、アゴニスト、アンタゴニストを選択する。

【0073】

本方法におけるNOR-1受容体タンパク質には、その部分ペプチドも含まれる。上記方法におけるNOR-1受容体タンパク質と被検化合物との結合活性の測定は、当業者においては公知の方法を利用して実施することができる。

【0074】

例えば、NOR-1と結合する化合物がタンパク質である場合には、本発明のスクリーニング方法は、ウエストウエスタンブロッティング法により行うことができる。具体的には、NOR-1タンパク質と結合するタンパク質（被検タンパク質）を発現していることが予想される組織または細胞よりファージベクター（λgt11, ZAPIIなど）を用いたcDNAライブラリーを作製し、これをLB-アガロース上で発現させフィルターに発現させたタンパク質を固定する。次いで、NOR-1タンパク質をビオチンラベル化、あるいはGSTタンパク質との融合タンパク質として精製し、これを上記フィルターと反応させ、被検タンパク質を発現しているプラークを、ストレプトアビジンや抗GST抗体などにより検出を行うことにより、結合活性を評価することができる。

【0075】

また、本発明のアレルギー性疾患治療薬のための候補化合物のスクリーニング

方法の別の態様においては、下記の工程を含む。

- (1) NOR-1受容体タンパク質または該タンパク質のリガンド結合領域と転写調節タンパク質との融合タンパク質を発現し得るDNA、および該転写調節タンパク質の結合するDNA配列の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合した構造を有するDNA、を導入した細胞を提供する工程
- (2) 前記細胞と被検化合物を接触させる工程
- (3) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程
- (4) 前記活性を変化させる化合物を選択する工程

【0076】

上記方法における「機能的に結合した」とは、NOR-1受容体タンパク質または該タンパク質のリガンド結合領域が、該受容体タンパク質のリガンドもしくはリガンド様化合物と結合した際に、レポーター遺伝子が発現し得るように結合した状態を指す。上記方法における「転写調節領域結合タンパク質」としては、通常、GAL4タンパク質を好適に使用することができる。また、上記「転写調節領域結合タンパク質の結合し得るDNA配列」としては、例えば、GAL4結合DNA領域を挙げることができる。さらに本発明の上記スクリーニング方法は、ハイスループットで行うことが可能である。

【0077】

上記スクリーニング方法の好ましい態様としては、「twoハイブリッドシステム」(例えば、「MATCHMARKER Two-Hybrid System」,「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」,「MATCHMAKER One-Hybrid System」(いずれもclontech社製)、「HybriZAP Two-Hybrid Vector System」(stratagene社製)、文献「Dalt on S, and Treisman R (1992)Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response factor to the c-fos serum response element. Cell 68, 597-612」)を用いてスクリーニングを行うことができる。本発明の上記方法は、より具体的には、以下のようにして実施することができるが、この方法に特に限定されず、当業者においては、以下に例示した方法を適宜改変して実施することが可能である。

【0078】

two-ハイブリッドシステムにおいては、NOR-1タンパク質またはその部分ペプチドを、通常、GAL4 DNA結合領域と融合させて酵母細胞の中で発現させ、NOR-1タンパク質またはその部分ペプチドと結合するタンパク質を発現していることが予想される細胞より、VP16またはGAL4転写活性化領域と融合する形で発現するようなcDNAライブラリーを作製し、これを上記酵母細胞に導入し、検出された陽性クローンからライブラリー由来cDNAを単離する（酵母細胞内でNOR-1タンパク質またはそのリガンド結合領域を含む部分ペプチドと結合するタンパク質が発現すると、両者の結合によりレポーター遺伝子が活性化され、陽性のクローンが確認できる）。単離したcDNAを大腸菌に導入して発現させることにより、該cDNAがコードするタンパク質を得ることができる。これによりNOR-1タンパク質またはその部分ペプチドに結合するタンパク質またはその遺伝子を調製することが可能である。twoハイブリッドシステムにおいて用いられるレポーター遺伝子としては、例えば、HIS3遺伝子の他、Ade2遺伝子、LacZ遺伝子、CAT遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor type1) 遺伝子等が挙げられるが、これらに制限されない。twoハイブリッド法によるスクリーニングは、酵母の他、哺乳動物細胞等を使って行うこともできる。

【0079】

本発明者らは、哺乳動物細胞を用いたtwoハイブリッドシステムを応用して、NOR-1タンパク質の転写活性化機能を上昇させるリガンドをスクリーニングすることが可能なハイスループット系を構築した。この系は、従来の哺乳動物におけるtwoハイブリッドシステムを改良したものであり、この系の概略を図3に示す（詳細は後述の実施例を参照）。

【0080】

本発明のスクリーニング方法は、好ましくは、上記の本発明者らによって開発されたハイスループット系を用いて行うことができる。NOR-1は、他のサブファミリー（ α と β ）とは異なり、転写活性にリガンド結合領域だけでなく、N末近傍のAF1領域（図4）が重要であることが、本発明者らによって示唆された。従って、上記の方法における、GAL4と融合タンパク質を形成させるNOR-1タンパク質は、リガンド結合領域だけではなく、全長タンパク質であることが好ましい。

【0081】

NOR-1は、アトピー性皮膚炎末梢血のような白血球が機能亢進した状態で発現誘導され、その結果として細胞にアポトーシスが誘導される可能性が高い。生体内に存在するリガンドは、核内受容体が高発現している場所に存在する可能性がある。そこで本発明者らは、このような条件で産生されると予想される低分子の脂溶性メディエーターをリガンド候補被検化合物として、上記の方法によりスクリーニングを行った。そして本発明者らは、脂溶性メディエーターの中から、リガンド活性物質として、prostaglandin A₂、prostaglandin A₁、15(R)-15-methyl prostaglandin A₂、16-phenoxy tetranor prostaglandin A₂、17-phenyl trinor prostaglandin A₂等を取得することに成功した。これらの化合物は、シクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンである。このことは、本発明の方法によってNOR-1(MINOR)の転写活性化機能をアップレギュレートするリガンド活性物質を実際に取得することが可能であることを示すものである。

【0082】

NOR-1タンパク質と結合する化合物のスクリーニングは、アフィニティークロマトグラフィーを用いて行うこともできる。例えば、NOR-1タンパク質をアフィニティークラムの担体に固定し、ここにNOR-1タンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される被検試料を適用する。この場合の被検試料としては、例えば細胞抽出物、細胞溶解物等が挙げられる。被検試料を適用した後、カラムを洗浄し、NOR-1タンパク質と結合したタンパク質を調製することができる。

【0083】

取得したタンパク質は、例えば、該タンパク質のアミノ酸配列を分析し、それを基にオリゴDNAを合成し、該DNAをプローブとしてcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、該タンパク質をコードするDNAを得ることができる。

【0084】

本発明において、結合した化合物を検出又は測定する手段として表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを使用することもできる。表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーは、NOR-1タンパク質と被検化合物との間の

相互作用を、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することが可能である（例えばBIAcore、Pharmacia製）。従って、BIAcore等のバイオセンサーを用いることによりNOR-1タンパク質と被検化合物との結合を評価することが可能である。

【0085】

NOR-1タンパク質と結合する化合物を単離することは、当業者においては通常行い得ることである。上記以外の方法として、例えば、固定したNOR-1タンパク質に、合成化合物、天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーを作用させ、本発明のタンパク質に結合する分子をスクリーニングする方法等を示すことができる。

【0086】

本発明による、候補化合物のNOR-1遺伝子の発現レベルや転写活性化機構に与える影響を検出する方法に用いられる細胞、並びに該遺伝子の発現レベルを調べるためのポリヌクレオチド、あるいは抗体を組み合わせ、この方法のための検出用キットとすることができる。キットには、陽性対照や陰性対照として用いられる候補化合物や指示書を組み合わせることもできる。本発明に基づく候補化合物のNOR-1遺伝子の発現レベルや転写活性化機構に与える影響を検出するためのキットは、例えば、NOR-1遺伝子の発現レベルや転写活性化機構を修飾する化合物のスクリーニング用キットとして利用することができる。

【0087】

本発明のスクリーニング方法に用いる被検候補化合物としては、特に制限されないが、例えば、ステロイド誘導体等既存の化学的方法により合成された化合物標品、コンビナトリアルケミストリーにより合成された化合物標品、動・植物組織の抽出物もしくは微生物培養物等の複数の化合物を含む混合物、精製タンパク質、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドのライブラリー等が挙げられる。また、本発明のNOR-1タンパク質と結合する化合物のスクリーニング方法においては、特に制限されないが、低分子の脂溶性メディエーターを被検候補化合物とすることが好ましい。

【0088】

本発明のスクリーニング方法によって選択される化合物は、アレルギー性疾患の治療薬として有用である。NOR-1遺伝子は、アトピー性皮膚炎の寛解期に好酸球の減少に伴って好酸球において発現が増加する。従って、この遺伝子の発現あるいは機能を増強することができる化合物には、アトピー性皮膚炎の症状を抑える作用が期待できる。また、本発明のスクリーニング方法によって選択される化合物は、NOR-1活性化とそれに伴う好酸球アポトーシス誘導という全く新しい作用機序を有するアレルギー性疾患治療薬となるものと期待される。従って本発明は、本発明のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含有するアレルギー性疾患治療薬を提供する。なお上記化合物には、本発明のスクリーニング方法を用いて単離しうる化合物の構造の一部を、付加、欠失及び／又は置換により変換される化合物も含まれる。上述のように、脂溶性メディエーターの中から、NOR-1の転写活性化能を増強する化合物（NOR-1のリガンド活性物質）として本発明者らにより、シクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンが見出された。従って、本発明のアレルギー性疾患治療薬として、例えば、本発明のスクリーニング方法によって得ることができるシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンを有効成分として含有するアレルギー性疾患治療薬を好適に挙げることもできる。該プロスタグランジンの具体例としては、prostaglandin A₂、prostaglandin A₁、15(R)-15-methyl prostaglandin A₂、16-phenoxy tetranor prostaglandin A₂、17-phenyl trinor prostaglandin A₂等を挙げることができる。

【0089】

また、NOR-1(MINOR)の合成リガンドは、当業者においてはNOR-1の立体構造とのドッキングスタディーから容易に推察され合成展開することが可能である。

【0090】

「ドッキングスタディー」とは 通常、受容体の立体構造に基づいた3Dクエリーファーマコファーモデルにより、数10万個の化合物の3次元DBの中から、リガンド結合ドメインにフィットする化合物やコンフォメーションをコンピュータ上で探索することを言う。ドッキングスタディーは、例えば、以下の(1)～(4)の手順に従って行われる。

- (1) Modelerによるタンパクの3D構造の構築 (ホモロジーモデル)
- (2) C2. LigandFitによる結合部位の検索
- (3) C2・SBFによる結合部位のPharmacophore クエリ構築
- (4) Pharmacophoreクエリによる3Dデータベースの検索

【0091】

3D Pharmacophore検索に関する文献としては、例えば、Pharmacophore Perception, Development, and Use in Drug Design (Int Biotechnology Series, 2)-US-ISBN:0963681761 (Hardcover) Guner, Osman F. (Edt) /Publisher: Intl Univ Line Published 1999/12等を挙げることができる。

【0092】

このような合成リガンドを有効成分として含有する薬剤もまた、本発明のアレルギー性疾患治療薬に含まれる。また、上記合成リガンドは被検候補化合物として、本発明の上記方法に供することにより、真のリガンドであるか否かを評価することも可能である。

【0093】

本発明のアレルギー性疾患治療薬は、生理学的に許容される担体、賦形剤、あるいは希釈剤等と混合することによって製造することも可能である。本発明のアレルギー性疾患の治療剤は、アレルギー症状の改善を目的として、経口、あるいは非経口的に投与することができる。

【0094】

経口剤としては、顆粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、溶剤、乳剤、あるいは懸濁剤等の剤型を選択することができる。非経口剤としては、例えば、注射剤、座薬、塗り薬等を挙げることができる。注射剤としては、皮下注射剤、筋肉注射剤、あるいは腹腔内注射剤等を示すことができる。

【0095】

投与量は、患者の年齢、性別、体重および症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分の種類などにより異なるが、通常成人一人あたり、一回につき0.1 mgから500 mgの範囲で、好ましくは0.5 mgから20 mgの範囲で投与することができる。しかし、投与量は種々の条件により変

動するため、上記投与量よりも少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を超える投与量が必要な場合もある。

【0096】

また本発明者らは、NOR-1受容体タンパク質の発現が亢進することにより、細胞がアポトーシス誘導することを見出した。従って、細胞においてNOR-1タンパク質を活性化させることにより、アポトーシスを誘導させることが可能である。従って本発明は、細胞におけるNOR-1受容体タンパク質を活性化させることを特徴とする、細胞のアポトーシス誘導方法を提供する。上記方法には、NOR-1遺伝子の発現を活性化させることにより、細胞のアポトーシス誘導を行う方法も含まれる。

【0097】

本方法の好ましい態様においては、本発明のスクリーニング方法によって得ることができる化合物またはシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンと細胞とを接触させることにより、アポトーシスの誘導を行う。本発明の上記方法における細胞は、好酸球細胞であることが好ましい。アトピー性皮膚炎の治療における寛解期において末梢血好酸球数が減少することが知られている。よって、本発明の方法を利用して好酸球を特異的に細胞死に導くことにより、アレルギー性疾患を治療することが可能と考えられる。即ち、本方法は、アレルギー性疾患の治療方法として有用である。

【0098】

また、本発明のスクリーニング方法によって得ることができる化合物またはシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンは、アポトーシスを誘導する作用があるものと考えられることから、本発明は、これら化合物を含有するアポトーシス誘導剤も提供する。

【0099】

【実施例】

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

[実施例1] ディファレンシャルディスプレイ解析

アトピー性皮膚炎の同一患者における増悪期と、薬物治療その他による寛解期の末梢血より単離した血球細胞を比較して、発現変動している新しい治療関連遺伝子あるいは診断に有用な遺伝子を見出すことを目的としてスクリーニングを行った。

【0 1 0 0】

(1) 被検者

血液を採取した7例のアトピー性皮膚炎患者のプロフィールを表2に示す。アレルギー非特異的 (Total IgE)、ダニおよびスギ特異的IgEはEIA法により測定した。すなわち、抗ヒトIgE抗体を結合させたキャップに被検血清を反応させ、血清中のアレルギー非特異的IgE抗体、またはダニ、スギ特異的IgE抗体を結合させた。次に、 β -D-ガラクトシダーゼ標識抗ヒトIgE抗体と基質液 (4-メチルウンベルフェリル- β -D-ガラクトピラノシド) を加え、反応させて蛍光物質を生成させた。反応停止液を加えて反応を停止させ、同時測定の標準IgEの蛍光強度より抗体濃度を決定した。LDHの測定は、UV法 (Wroblewski-La Due法) により、ピルビン酸とNADHの反応によるNADHの減少速度を吸光度の減少から算出した。LDH値の測定には、LタイプワコーLDH (和光純薬) と7170型自動分析装置 (日立) を用いた。好酸球数は、EDTA添加血液 2ml を試料として鏡検法と自動血球分析装置SE-9000 (RF/DCインピーダンス方式、Sysmex製造) により測定した。

【0 1 0 1】

【表2】

患者番号	1	2	3	4	5	6	7
Donor ID	PA00002	PA00068	PA00069	PA00070	PA00071	PA00073	PA00164
病態	増悪期 寛解期	増悪期 寛解期	増悪期 寛解期	増悪期 寛解期	増悪期 寛解期	増悪期 寛解期	増悪期 寛解期
T-IgE	6100 7100	2600 2100	13000 20000	15000 15000	9300 9200	17000 8800	2100 1600
タニ	82.1 73.8	66.4 >100	72.2 66.7	85.9 90.9	74.6 70.8	88 >100	>100 82.8
スギ	57.1 77.2	14.4 19.7	15.2 22.5	61.9 59.6	64.2 71.1	18.3 9.27	6.51 3.61
LDH	910 475	293 296	398 250	173 182	534 297	620 598	343 393
好酸球(%)	16 11.7	23.2 10.1	16 6.2	8.6 12.1	28.2 13.4	13.4 12.3	12.9 10.6
好酸球 (/mm ³)	1620 611	1420 468	2070 527	738 752	1830 972	945 846	898 847
内服	アルデシン吸、テ オドール インターール吸、ザ ジデン	ザジデン		ザジデン、消風 散 アタラックスP	セルテ クト インターール経口	ザジデンDS、 インターール無し	プレドニン(181 のみ) テオロング。ア ルデシン
外用	身体:ザルック ス 顔: ロコイド	身体:ロコイド 顔:非ステロイド	身体:ザルック ス 顔:非ステロイド	身体:ロコイド 顔:非ステロイド	身体:ロコイド 顔:非ステロイド	身体:ザルック ス デロンV 顔: ロコイド	身体:ザルック ス 顔: ロコイド
他の疾病	喘息(中等症)				喘息(中等症)		喘息(重/軽症)

【0102】

(2) デイファレンシャルディスプレイ解析

患者から採取した全血に3%デキストラン溶液を加えて30分室温放置し、赤血球を沈降させた。上層の白血球画分を回収し、フィコール溶液 (Ficoll-Paque PLUS; アマシャムファルマシアバイオテク) の上に載せて1500rpm、30分室温で遠心した。下層に回収された顆粒球画分をCD16抗体磁気ビーズと4℃で30分反応させ、MACSを用いた分離でトラップさせずに溶出する細胞を好酸球として実験に用いた。

【0103】

上記のように調製した好酸球を Isogen (日本ジーン; 和光純薬) に溶解し、この溶液から、Isogenに添付されているプロトコルに従ってRNAを分離した。クロロホルムを加え、攪拌遠心して水層を回収した。次にイソプロパノールを加え、攪拌遠心して沈殿の全RNAを回収した。回収した全RNAは、DNase (日本ジーン; 和光純薬) を加えて37℃15分反応させ、フェノール-クロロホルム抽出してエタノール沈殿でRNAを回収した。

【0104】

このように調製した全RNAを用いて蛍光デイファレンシャルディスプレイ (Fluorescent Differential Display, 「DD」と略記する) 解析を行った。DD解析は文献 (T. Itoら, 1994, FEBS Lett. 351: 231-236) に記載の方法に準じて行った。まず全RNAを逆転写し、cDNAを得た。第一次DD-PCR反応用には3種のアンカープライマーの各々について全RNAの各0.2 μ gを用いてcDNAを調製した。第二次DD-PCR反応用には、3種のアンカープライマーの各々についてRNA 0.4 μ gを用いてcDNAを調製した。いずれのcDNAも、0.4ng/ μ l RNA相当の最終濃度に希釈し、実験に用いた。1反応あたり1 ng RNA相当のcDNAを用いてDD-PCR反応を行った。反応液の組成は表3の通りである。

【0105】

【表3】

cDNA (0.4ng/ μ l RNA相当)	2.5 μ l
任意プライマー (2 μ M)	2.5 μ l

10×AmpliTaq PCRバッファー	1.0 μ l
2.5mM dNTP	0.8 μ l
50 μ M アンカープライマー (GT15A, GT15C, GT15G)	0.1 μ l
Gene Taq (5U/ μ l)	0.05 μ l
AmpliTaq (5U/ μ l)	0.05 μ l
dH ₂ O	3.0 μ l
<hr/>	
総量	10.0 μ l
<hr/>	

【 0 1 0 6 】

PCRの反応条件は、「95℃3分、40℃5分、72℃5分」を1サイクル、続いて、「94℃15秒、40℃2分、72℃1分」を30サイクルの後、72℃5分、その後連続的に4℃にした。

使用したプライマー対はアンカープライマーであるGT15A（配列番号：3）、GT15C（配列番号：4）、およびGT15G（配列番号：5）に対して任意プライマーをそれぞれAG 1～110、AG 111～199、およびAG 200～287を組み合わせ、計287組の反応をおこなった。なお、任意プライマーとしてはGC含量50%の10ヌクレオチドからなるオリゴマーを設計し、合成して用いた。

【 0 1 0 7 】

ゲル電気泳動は、6%変性ポリアクリルアミドゲルを作製し、2.5 μ lの試料をアプライし、40Wで210分間泳動した。その後、日立製蛍光イメージアナライザーFMBIO IIを用いてゲル板をスキャンし、蛍光検出によって泳動画像を得た。

【 0 1 0 8 】

増悪期及び寛解期の両サンプルを並べて泳動し、ほとんどの患者で同方向に発現が変動している遺伝子バンドを目で判定し、切り取ってTAクローニングおよび配列決定を行った。その結果、増悪期に比べ寛解期に有意に発現の亢進するDNA配列（DD解析のバンドID 2250-01；以後、この配列を「2250-01」と称す）を見出した。バンドID 2250-01の増幅に用いたプライマーセットを以下に示す。

バンド I D : 2250-01

断片の長さ : 421 bp (プライマーの配列を除く)

アンカープライマー : GT15C

任意プライマーの名前 : AG00164

任意プライマーの配列 : CATTCTCAGG (配列番号 : 6)

【 0 1 0 9 】

(3) 発現解析

2250-01の発現量を定量的に確認するために、同一臨床サンプルを用いてさらにABI 7700による定量的PCRを行った。ABI 7700による測定に用いたプライマーおよびTaqManプローブは、ディファレンシャルディスプレイ法によって得られた配列情報からPrimer Express (PEバイオシステムズ) により設計した。TaqManプローブの5'末端はFAM(6-carboxy-fluorescein)で、また3'末端はTAMRA(6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine)で標識されている

・ 2250-01 フォワードプライマー

TGCCTTGTCTAGAACTGCACAG (配列番号 : 7)

・ 2250-01 リバープライマー

AAGTGTGTTGGACCAAGCAGC (配列番号 : 8)

・ 2250-01 TaqMan プローブ

AAGTCAGTGCAGAGCCTGGATGAGGA (配列番号 : 9)

鋳型には全RNAからポリT(12~18mer)をプライマーとして逆転写したcDNAを用いた。コピー数を算出する標準曲線のために両プライマーで増幅される塩基配列領域を含むプラスミドクローンを各々の遺伝子について準備し、その段階希釈を鋳型として反応を行った。PCR増幅のモニタリングのための反応液の組成は表 4 に示した。

【 0 1 1 0 】

【表 4】

ABI-PRISM 7700の反応組成 (1 ウェルあたりの反応量)

滅菌蒸留水

25.66 (μL)

10x TaqMan バッファーA	5
25mM MgCl ₂	7
dATP(10mM)	1.2
dCTP(10mM)	1.2
dGTP(10mM)	1.2
dUTP(10mM)	1.2
Forward Primer (100 μ M)	0.15
Reverse Primer (100 μ M)	0.15
TaqMan プローブ (6.7 μ M)	1.49
AmpliTaq Gold (5U/ μ L)	0.25
AmpErase UNG (1U/ μ L)	0.5
テンプレート溶液	5
<hr/>	
総量	50
<hr/>	

【 0 1 1 1 】

また、試料中のcDNA濃度の差を補正するため、補正用内部標準として β -アクチン(β -actin)遺伝子について同様の定量解析を行い、それら遺伝子のコピー数を基に補正して、目的遺伝子のコピー数を算出した。 β -アクチン(β -actin)遺伝子の定量には、ヒトcDNAを鋳型として用いた。

【 0 1 1 2 】

β アクチン測定用のプライマーとプローブは、TaqMan β -actin Control Reagents (PEバイオシステムズ) に添付のものを用いて行った。塩基配列は以下の通りである。 β アクチンにより補正した「2250-01」発現量 (copy/ng RNA) を表5および図1に示す。

・ β アクチンフォワードプライマー

TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A (配列番号：10)

・ β アクチンリバースプライマー

CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G (配列番号：11)

・ β アクチンTaqManプローブ

5'-(FAM)ATGCCC-T(TAMRA)-CCCCATGCCATCCTGCGTp-3' (配列番号：12)

FAM:6-carboxy-fluorescein

TAMRA:6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine

【0113】

【表5】

2250-01発現量 (copy/ng RNA)

患者番号	増悪期	寛解期
1	454.19	5298.42
2	137.06	167.13
3	53.86	4543.94
4	1577.46	642.43
5	403.84	4655.96
6	3745.25	801.14
7	173.98	286.83

【0114】

(4) 統計解析

上記のデータを利用して、パラメトリック多重比較検定、およびノンパラメトリック多重比較検定を行った。上記のアトピー性皮膚炎患者7例の内4例（患者番号1, 2, 3, 5）については、治療による寛解期への移行に伴って好酸球数が顕著に減少する。血中好酸球数は、アトピー性皮膚炎の有用な臨床指標となっている。そこで、寛解期への移行に伴って好酸球数が顕著に減少する患者試料（患者番号1, 2, 3, 5）（n=4）4例のみについても統計的に解析した。統計解析は、The SAS SYSTEMのSAS前臨床パッケージVersion 4.0 (SAS Institute Inc.)を用いて行った。結果を表6に示す。

【0115】

【表 6】

2250-01発現量 (copy/ng RNA)

対応のある 2 群の検定		好酸球減少群
		(n=4)について
t検定	Wilcoxon検定	の対応のある
パラメトリック	ノンパラメトリック	2 群のt検定
E<R p=0.274	E<R p=0.2969	E<R p=0.0572

【0 1 1 6】

その結果、上記のアトピー性皮膚炎患者 7 例中 3 例の患者（患者番号1, 3, 5）において、2250-01の発現の著しい上昇が観察された。この 3 例の患者は、治療による寛解期への移行に伴って好酸球数が顕著に減少する 4 例（表 2 参照）の患者に含まれていた。血中好酸球数は、アトピー性皮膚炎の有用な臨床指標となっている。そこで、寛解期への移行に伴って好酸球数が顕著に減少するこれら 4 例の患者試料（患者番号1, 2, 3, 5）（n=4）の2250-01の発現量の変化を統計的に解析した。統計解析は、The SAS SYSTEMのSAS前臨床パッケージVersion 4.0（SAS Institute Inc.）を用いて行った。

【0 1 1 7】

その結果、増悪期に比べ寛解期で有意に発現が上昇することが確認された（p=0.0572）。逆に好酸球の減少が見られない患者には、発現の著しい低下が見られた（患者番号4, 6）。以上の知見は、2250-01がアトピー性皮膚炎の寛解期における好酸球の減少に伴って、発現が上昇することを示している。

【0 1 1 8】

[実施例 2] 各種血液細胞での2250-01の発現

5人の健常人の末梢血から分離した細胞での2250-01の発現を調べた。好酸球（E）の分離は上記の通り行った。好中球（N）は好酸球を溶出させた後、CD16抗体磁気ビーズでトラップされた細胞を磁界から外して溶出、回収して調製した。一

方、フィコール遠心分離で中間層に回収される単球画分を、MACS CD3抗体磁気ビーズにより溶出画分 (M:monocyteとB cell の混合物) とトラップされる画分 (T cell画分) に分離した。次に、溶出画分をMACS CD14抗体磁気ビーズにより、溶出画分 (B cell画分) とトラップされる画分 (moocyte画分) に分け、それぞれを精製T細胞、精製B細胞、そして精製単球とした。

【0119】

好酸球はIsogen、好中球、T細胞、B細胞、そして単球はRNeasy (Qiagen)を用いて可溶化し、全RNA抽出、DNase処理後 (方法は前述の通り) 遺伝子発現解析に供した。用いたプライマー、プローブ等は上記と同一である。これらの血球細胞での平均発現量 (AVERAGE: copy/ng (補正值)) は以下の通りであった。

好酸球(E) :960

好中球(N) : 73

好塩基球(B) : 36

T細胞(T) : 11

単球(M) :103

この結果は、2250-01が好酸球特異的に発現していることを示している。

【0120】

[実施例3] 塩基配列の伸長

実施例1で決定した塩基配列に基づいて、5'RACE法により2250-01の塩基配列解析を進めた。さらに、SMART cDNA Library Construction kit (CLONTECH)により末梢血好酸球RNAから作製したファージcDNAライブラリーを用いて、プラークハイブリダイゼーションによるクローニングを行った。2250-01の配列内に設計したプライマー2250-01F及び2250-01Rを用いて2250-01の配列を含むプラスミドを鋳型に増幅後、精製した259bpのPCR産物をプローブとして用いた。その結果2250-01の配列を含む約2kbのインサートを持つクローンが得られた。決定した塩基配列2087bpを配列番号: 15に示す。ゲノムデータベース解析の結果、この配列はNOR-1 (MINOR) と呼ばれる核内オーファン受容体のイントロン部分であることが分かった。

・プライマー配列

2250-01F : GTTCCAGGCAATAACATCATACC (配列番号： 1 3)

2250-01R : GCTACTTGTGAAACTCCCAAATG (配列番号： 1 4)

【 0 1 2 1 】

〔実施例 4〕 NOR-1遺伝子の発現解析

NOR-1(MINOR)の報告されているエクソン配列について7700による発現測定を行った。TaqMan法に使用したプライマーおよびプローブは次の通りである。

Primer1(5') : TGGGTGCCCTGGTAGAACT (配列番号： 1 6)

Primer2(3') : GCTTCAGGTAGAAGATGCGCT (配列番号： 1 7)

TaqMan probe : AGGAAGATCTGCACCCTGGGCCTC (配列番号： 1 8)

その結果、イントロン部分で測定したときの結果と同様に、好酸球減少のみられた著効例の寛解期に誘導されるという傾向は再現した(図2)。

アトピー性皮膚炎の、治療による寛解期に末梢血好酸球でこのようなアポトーティックな性格が示唆されるような遺伝子が亢進しているのは、末梢血好酸球数の減少とよく対応しており、この遺伝子の発現誘導は治療効果と相関する可能性が高いと考えられる。

【 0 1 2 2 】

〔実施例 5〕 NOR-1受容体リガンドの探索

好酸球を特異的に細胞死に導く経路を、NOR-1(MINOR)の機能の増強を通じて促進することは、喘息のみでなく、本発明者らが調べたアトピー性皮膚炎も含めた種々のアレルギー性疾患の治療に繋がる可能性が高い。NOR-1(MINOR)は構造上核内受容体であるが、オーファン受容体であり生体内リガンドや活性化物質はまだわかっていない。もしもそれらが見出されれば、好酸球細胞内でダイレクトにNOR-1(MINOR)を活性化しアポトーシスを促進させることができる。従って、リガンド活性物質は抗アレルギー薬としての可能性が高いと考え、リガンドスクリーニングのためのハイスループット系を構築した。

【 0 1 2 3 】

Mammalian Two Hybrid のシステムを若干改変し、図3のように、pBIND の中にNOR-1(MINOR)のリガンド結合領域配列または全長遺伝子(図4)を挿入し、NOR-1とGAL4のDNA結合領域がin frameで融合したタンパク質が発現されるようにし

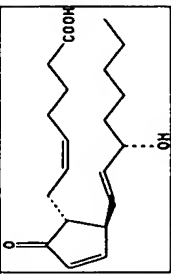
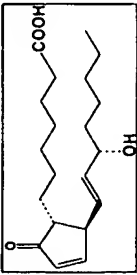
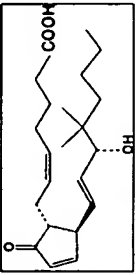
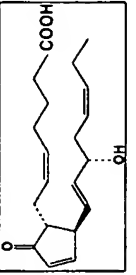
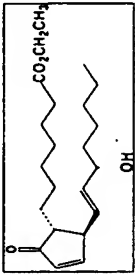
た。NOR-1(MINOR)の場合は、他のサブファミリー (α と β) と異なり、転写活性にN末に近いA F 1領域が重要であることが推察され、Mammalian Hybrid システムにおいてもリガンド結合領域だけでなく全長遺伝子を挿入することが必要であることが分かった。実際、リガンド結合領域のみを組み込んだスクリーニング系では、哺乳類のメタボリックマップ上に存在する、生体内リガンドの可能性のあるどのような脂溶性代謝物にも活性が見出されなかった。NOR-1(MINOR)の全長遺伝子をpBINDに挿入したプラスミドとGAL4結合サイトをもったルシフェラーゼレポータープラスミドをNIH3T3細胞にコトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を自動測定した。この系にさらに低分子物質を加えて、転写増強活性でスクリーニングを行うことができる。

【0124】

NOR-1(MINOR)は、アトピー性皮膚炎末梢血のような白血球が機能亢進した状態で発現誘導され、その結果として細胞にアポトーシスが誘導される可能性が高い。生体内に存在するリガンドは、核内受容体が高発現している場所に存在する可能性がある。そこで、このような条件で産生されると予想される低分子の脂溶性メディエーターをリガンド候補としてアッセイ系に加え、ルシフェラーゼ活性の増強作用で評価した。脂溶性メディエーターの中から、prostaglandin A₂、prostaglandin A₁、15(R)-15-methyl prostaglandin A₂、16-phenoxy tetranor prostaglandin A₂、17-phenyl trinor prostaglandin A₂等のシクロペンテノン構造をもったプロスタグランジンに、NOR-1(MINOR)の転写活性化能を増強させる作用があることを見出した(図5、表7～9)。このように本発明者らの確立した方法によって、ハイスループットでNOR-1(MINOR)の生体内リガンド及び合成リガンドを発見する道が開かれたとともに、prostaglandin A₂、prostaglandin A₁等の化合物およびその近辺の代謝物が、NOR-1(MINOR)の真の生体内リガンドとしての可能性が高いことが明らかになった。

【0125】

【表 7】

化合物名	構造式	細胞所見	γ-LBD(NORI) 転写促進活性		γ-全量(NORI) 転写促進活性	
			RXR(+)	RXR(-)	RXR(+)	RXR(-)
Prostaglandin A ₂		10 μM で変形 30 μM で死滅	x	x	○ 10 μM	○ 10 μM
Prostaglandin A ₁		10 μM で変形 30 μM で死滅	x	x	○ 10 μM	?
16,16-dimethyl Prostaglandin A ₂		10 μM で死滅	裏道試	裏道試	x	x
Prostaglandin A ₃			x	x	x	x
Prostaglandin A ₁ ethyl ester		10 μM で変形	x	x	x	x

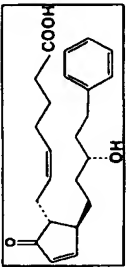
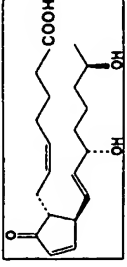
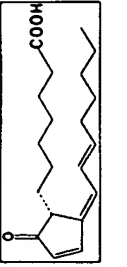
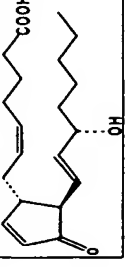
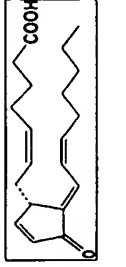
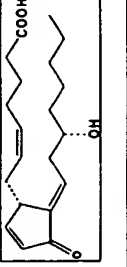
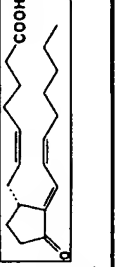
【0126】

【表 8】

15-epi Prostaglandin A ₁			x	x	x	x	○ 10 μM
16,16-dimethyl Prostaglandin A ₁		10 μMで死滅		x	x	x	○ 10 μM
13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin A ₂			x	x	x	x	○ 10 μM
15(R)-15-methyl Prostaglandin A ₂		10 μMで変形 30 μMで死滅	x	x	x	x	○ 10 μM
15-deoxy-Δ ^{12,14} -Prostaglandin A ₂			x	x	x	x	○ 30 μM
16-phenoxy tetranor Prostaglandin A ₂		30 μMで変形	x	x	x	x	○ 30 μM
17-phenyl trinor Prostaglandin A ₂		10 μMで変形 30 μMで死滅	x	x	x	x	○ 10 μM

【0127】

【表 9】

17-phenyl trino-13,14-dihydro Prostaglandin A ₂			x	x	x	x
19(R)-hydroxy Prostaglandin A ₂			x	x	x	x
15-deoxy-Δ ^{12,14} -Prostaglandin A ₁			x	x	x	x
Prostaglandin J ₂		10 μM で変形	x	x	x	?
15-deoxy-Δ ^{12,14} -Prostaglandin J ₂			x	x	x	x
Δ ¹² -Prostaglandin J ₂		10 μM で変形 (もしくは死滅直前)	?	x	x	x
9,10-dihydro-15-deoxy-Δ ^{12,14} -Prostaglandin J ₂ (CAY10410)			x	x	x	x

【0128】

【発明の効果】

本発明により、アトピー性皮膚炎患者の増悪期と寛解期とで好酸球において発現に差の見られる遺伝子が提供された。本発明の遺伝子の発現を指標にすることにより、アレルギー性疾患の検査、および治療薬候補化合物のスクリーニングを行うことが可能となった。

本発明におけるアレルギー性疾患関連遺伝子は、アレルゲンの種類にかかわらず、簡便にその発現レベルを知ることができる。従って、アレルギー反応の病態を総合的に把握することができる。

【0129】

また本発明のアレルギー性疾患の検査方法は、末梢血好酸球を試料としてその発現レベルを解析することができるので、患者に対する侵襲性が低い。遺伝子解析技術は、年々ハイスループット化、低価格化が進行している。従って本発明によるアレルギー性疾患の検査方法は、近い将来、ベッドサイドにおける重要な診断方法となることが期待される。この意味で本発明の方法の診断的価値は高い。

【0130】

更に、本発明のスクリーニング方法は、アトピー性皮膚炎の代表的な臨床マーカーである好酸球の増減と密接に関連する遺伝子機能を指標として実施される。従って、このスクリーニング方法によって見出すことができる化合物は、幅広いアレルギーの病態制御に有用であると期待できる。

また本発明により提供されるアレルギー性疾患治療薬は、NOR-1の活性化とそれに伴う好酸球のアポトーシス誘導という全く新しい作用機序をもった医薬品として有用である。

【0131】**【配列表】**

SEQUENCE LISTING

<110> Genox Research, Inc.

National Center for Child Health and Development

<120> Methods for examination for allergic diseases, and drugs for treating allergic diseases

<130> G1-A0212

<140>

<141>

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 3794

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (730)..(2607)

<400> 1

ataaatgacg tgccgagaga gcgagcgaac gcgcagccgg gagagcggag tctcctgcct 60

cccgcacccc acccctccag ctctgtctcc tctctcgttc ccatacaca gacgcgtca 120

caccgctcc ctactcgca cacacagaca caagcgcgca cacaggctcc gcacacacac 180

tctgtctctc cgcgcgtca caccctctt gccctgagcc cttgccggtg cagcgcggcg 240

ccgcagctgg acgcccctcc cgggctcact ttgcaacgct gacggtgccg gcagtggccg 300

tggaggtggg aacagcggcg gcacccctccc ccttggtcac agcccaagcc aggacgcccg 360

cggaacctct cggctgtgct ctcccatgag tcgggatcgc agcatcccc accagccgct 420

caccgcctcc gggagccgct gggcttgtac accgcagccc ttccgggaca gcagctgtga 480

ctccccccca gtgcagattt cgggacagct ctctagaaac tcgctctaaa gacggaaccg 540

ccacagcact caaagcccac tgcggaagag ggcagcccgg caagcccggg ccctgagcct 600

ggacccttag cggtgccggg cagcactgcc ggcgcttcgc ctgccggac gtccgctcct 660

cctacactct cagcctccgc tggagagacc ccagcccca ccattcagcg cgcaagatac 720

cctccagat atg ccc tgc gtc caa gcc caa tat agc cct tcc cct cca ggt 771

Met Pro Cys Val Gln Ala Gln Tyr Ser Pro Ser Pro Pro Gly

1

5

10

tcc agt tat gcg gcg cag aca tac agc tcg gaa tac acc acg gag atc 819

Ser Ser Tyr Ala Ala Gln Thr Tyr Ser Ser Glu Tyr Thr Thr Glu Ile

15

20

25

30

atg aac ccc gac tac acc aag ctg acc atg gac ctt ggc agc act gag 867

Met Asn Pro Asp Tyr Thr Lys Leu Thr Met Asp Leu Gly Ser Thr Glu

35

40

45

atc acg gct aca gcc acc acg tcc ctg ccc agc atc agt acc ttc gtg 915

Ile Thr Ala Thr Ala Thr Thr Ser Leu Pro Ser Ile Ser Thr Phe Val

50

55

60

gag ggc tac tcg agc aac tac gaa ctc aag cct tcc tgc gtg tac caa 963

Glu Gly Tyr Ser Ser Asn Tyr Glu Leu Lys Pro Ser Cys Val Tyr Gln

65

70

75

atg cag cgg ccc ttg atc aaa gtg gag gag ggg cgg gcg ccc agc tac 1011

Met Gln Arg Pro Leu Ile Lys Val Glu Glu Gly Arg Ala Pro Ser Tyr

80

85

90

cat cac cat cac cac cac cac cac cac cac cac cat cac cag cag 1059

His His His His His His His His His His His His His His His Gln Gln

95

100

105

110

cag cat cag cag cca tcc att cct cca gcc tcc agc ccg gag gac gag 1107

Gln His Gln Gln Pro Ser Ile Pro Pro Ala Ser Ser Pro Glu Asp Glu

115

120

125

gtg ctg ccc agc acc tcc atg tac ttc aag cag tcc cca ccg tcc acc 1155

Val Leu Pro Ser Thr Ser Met Tyr Phe Lys Gln Ser Pro Pro Ser Thr

130

135

140

ccc acc acg ccg gcc ttc ccc ccg cag gcg ggg gcg tta tgg gac gag 1203

Pro Thr Thr Pro Ala Phe Pro Pro Gln Ala Gly Ala Leu Trp Asp Glu

145

150

155

gca ctg ccc tcg gcg ccc ggc tgc atc gca ccc ggc ccg ctg ctg gac 1251

Ala Leu Pro Ser Ala Pro Gly Cys Ile Ala Pro Gly Pro Leu Leu Asp

160

165

170

ccg ccg atg aag gcg gtc ccc acg gtg gcc ggc gcg cgc ttc ccg ctc 1299

Pro Pro Met Lys Ala Val Pro Thr Val Ala Gly Ala Arg Phe Pro Leu

175

180

185

190

ttc cac ttc aag ccc tcg ccg ccg cat ccc ccc gcg ccc agc ccg gcc 1347

Phe His Phe Lys Pro Ser Pro Pro His Pro Pro Ala Pro Ser Pro Ala

195

200

205

ggc ggc cac cac ctc ggc tac gac ccg acg gcc gct gcc gcg ctc agc 1395

Gly Gly His His Leu Gly Tyr Asp Pro Thr Ala Ala Ala Ala Leu Ser

210

215

220

ctg ccg ctg gga gcc gca gcc gcc gcg ggc agc cag gcc gcc gcg ctt 1443

Leu Pro Leu Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ser Gln Ala Ala Ala Leu

225

230

235

gag agc cac ccg tac ggg ctg ccg ctg gcc aag agg gcg gcc ccg ctg 1491

Glu Ser His Pro Tyr Gly Leu Pro Leu Ala Lys Arg Ala Ala Pro Leu

240

245

250

gcc ttc ccg cct ctc ggc ctc acg ccc tcc cct acc gcg tcc agc ctg 1539

Ala Phe Pro Pro Leu Gly Leu Thr Pro Ser Pro Thr Ala Ser Ser Leu

255

260

265

270

ctg ggc gag agt ccc agc ctg ccg tcg ccg ccc agc agg agc tcg tcg 1587

Leu Gly Glu Ser Pro Ser Leu Pro Ser Pro Pro Ser Arg Ser Ser Ser

275	280	285	
tct ggc gag ggc acg tgt gcc gtg tgc ggg gac aac gcc gcc tgc cag			1635
Ser Gly Glu Gly Thr Cys Ala Val Cys Gly Asp Asn Ala Ala Cys Gln			
290	295	300	
cac tac ggc gtg cga acc tgc gag ggc tgc aag ggc ttt ttc aag aga			1683
His Tyr Gly Val Arg Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Lys Arg			
305	310	315	
aca gtg cag aaa aat gca aaa tat gtt tgc ctg gca aat aaa aac tgc			1731
Thr Val Gln Lys Asn Ala Lys Tyr Val Cys Leu Ala Asn Lys Asn Cys			
320	325	330	
cca gta gac aag aga cgt cga aac cga tgt cag tac tgt cga ttt cag			1779
Pro Val Asp Lys Arg Arg Arg Asn Arg Cys Gln Tyr Cys Arg Phe Gln			
335	340	345	350
aag tgt ctc agt gtt gga atg gta aaa gaa gtt gtc cgt aca gat agt			1827
Lys Cys Leu Ser Val Gly Met Val Lys Glu Val Val Arg Thr Asp Ser			
355	360	365	
ctg aaa ggg agg aga ggt cgt ctg cct tcc aaa cca aag agc cca tta			1875
Leu Lys Gly Arg Arg Gly Arg Leu Pro Ser Lys Pro Lys Ser Pro Leu			
370	375	380	
caa cag gaa cct tct cag ccc tct cca cct tct cct cca atc tgc atg			1923
Gln Gln Glu Pro Ser Gln Pro Ser Pro Pro Ser Pro Pro Ile Cys Met			
385	390	395	

atg aat gcc ctt gtc cga gct tta aca gac tca aca ccc aga gat ctt 1971

Met Asn Ala Leu Val Arg Ala Leu Thr Asp Ser Thr Pro Arg Asp Leu

400

405

410

gat tat tcc aga tac tgt ccc act gac cag gct gct gca ggc aca gat 2019

Asp Tyr Ser Arg Tyr Cys Pro Thr Asp Gln Ala Ala Ala Gly Thr Asp

415

420

425

430

gct gag cat gtg caa caa ttc tac aac ctc ctg aca gcc tcc att gat 2067

Ala Glu His Val Gln Gln Phe Tyr Asn Leu Leu Thr Ala Ser Ile Asp

435

440

445

gta tcc aga agc tgg gca gaa aag att ccg gga ttt act gat ctc ccc 2115

Val Ser Arg Ser Trp Ala Glu Lys Ile Pro Gly Phe Thr Asp Leu Pro

450

455

460

aaa gaa gat cag aca tta ctt att gaa tca gcc ttt ttg gag ctg ttt 2163

Lys Glu Asp Gln Thr Leu Leu Ile Glu Ser Ala Phe Leu Glu Leu Phe

465

470

475

gtc ctc aga ctt tcc atc agg tca aac act gct gaa gat aag ttt gtg 2211

Val Leu Arg Leu Ser Ile Arg Ser Asn Thr Ala Glu Asp Lys Phe Val

480

485

490

ttc tgc aat gga ctt gtc ctg cat cga ctt cag tgc ctt cgt gga ttt 2259

Phe Cys Asn Gly Leu Val Leu His Arg Leu Gln Cys Leu Arg Gly Phe

495

500

505

510

ggg gag tgg ctc gac tct att aaa gac ttt tcc tta aat ttg cag agc 2307
Gly Glu Trp Leu Asp Ser Ile Lys Asp Phe Ser Leu Asn Leu Gln Ser
515 520 525

ctg aac ctt gat atc caa gcc tta gcc tgc ctg tca gca ctg agc atg 2355
Leu Asn Leu Asp Ile Gln Ala Leu Ala Cys Leu Ser Ala Leu Ser Met
530 535 540

atc aca gaa aga cat ggg tta aaa gaa cca aag aga gtc gaa gag cta 2403
Ile Thr Glu Arg His Gly Leu Lys Glu Pro Lys Arg Val Glu Glu Leu
545 550 555

tgc aac aag atc aca agc agt tta aaa gac cac cag agt aag gga cag 2451
Cys Asn Lys Ile Thr Ser Ser Leu Lys Asp His Gln Ser Lys Gly Gln
560 565 570

gct ctg gag ccc acc gag tcc aag gtc ctg ggt gcc ctg gta gaa ctg 2499
Ala Leu Glu Pro Thr Glu Ser Lys Val Leu Gly Ala Leu Val Glu Leu
575 580 585 590

agg aag atc tgc acc ctg ggc ctc cag cgc atc ttc tac ctg aag ctg 2547
Arg Lys Ile Cys Thr Leu Gly Leu Gln Arg Ile Phe Tyr Leu Lys Leu
595 600 605

gaa gac ttg gtg tct cca cct tcc atc att gac aag ctc ttc ctg gac 2595
Glu Asp Leu Val Ser Pro Pro Ser Ile Ile Asp Lys Leu Phe Leu Asp
610 615 620

acc cta cct ttc taatcaggag cagtggagca gtgagctgcc tcctctccta 2647

Thr Leu Pro Phe

625

gcacctgctt gctacgcagc aaagggatag gtttggaaac ctatcatttc ctgtccttcc 2707

ttaagaggaa aagcagctcc tgtagaaagc aaagactttc ttttttttct ggctcttttc 2767

cttacaacct aaagccagaa aacttgcaga gtatttgtgt ggggttgtgt tttatatatta 2827

ggcattgggg gatgggggtg gaggggggta tagttcatga gggttttcta agaaattgct 2887

aacaagcac ttttggacaa tgctatccca gcaggaaaa aaaggataat ataactgttt 2947

taaaactctt tctggggaat ccaattatag ttgctttgta tttaaaaaca agaacagcca 3007

agggttggtc gccagggtag gatgtgtctt aaagattggt cccttgaaaa tatgcttcct 3067

gtatcaaagg tacgtatgtg gtgcaaaca ggcagaaact tccttttaat ttccttcttc 3127

ctttatttta acaaatggtg aaagatggag gattacctac aaatcagaca tggcaaaaca 3187

ataatggctg tttgcttcca taaacaagt caatttttta aagtgtgtc ttactaagtc 3247

ttgtttatta actctccttt attctatatg gaaataaaaa ggaggcagtc atgttagcaa 3307

atgacacgtt aatatcccta gcagaggctg tgttcacctt ccctgtcgat cccttctgag 3367

gtatggccca tccaagactt ttaggccatt ctgatggaa ccagatccct gccctgactg 3427

tccagctatc ctgaaagtgg atcagattat aaactggatt acatgtaact gttttggttg 3487

tgttctatca accccaccag agttccctaa acttgcttca gttatagtaa ctgactggta 3547

tattcattca gaagcgccat aagtcagttg agtatttgat ccctagataa gaacatgcaa 3607

atcagcagga actggtcata cagggtgaagc accagggaca ataaggattt ttatagatat 3667

aatttaattt ttgttattgg ttaaggagac aattttggag agcaagcaaa tctttttaaa 3727

aaatagtatg aatgtgaata ctagaaaaga tttaaaaaat agtatgagtg tgagtactag 3787

gaaggat 3794

<210> 2

<211> 626

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Pro Cys Val Gln Ala Gln Tyr Ser Pro Ser Pro Pro Gly Ser Ser

1

5

10

15

Tyr Ala Ala Gln Thr Tyr Ser Ser Glu Tyr Thr Thr Glu Ile Met Asn

20

25

30

Pro Asp Tyr Thr Lys Leu Thr Met Asp Leu Gly Ser Thr Glu Ile Thr

35

40

45

Ala Thr Ala Thr Thr Ser Leu Pro Ser Ile Ser Thr Phe Val Glu Gly
50 55 60

Tyr Ser Ser Asn Tyr Glu Leu Lys Pro Ser Cys Val Tyr Gln Met Gln
65 70 75 80

Arg Pro Leu Ile Lys Val Glu Glu Gly Arg Ala Pro Ser Tyr His His
85 90 95

His His His His His His His His His His His His His Gln Gln Gln His
100 105 110

Gln Gln Pro Ser Ile Pro Pro Ala Ser Ser Pro Glu Asp Glu Val Leu
115 120 125

Pro Ser Thr Ser Met Tyr Phe Lys Gln Ser Pro Pro Ser Thr Pro Thr
130 135 140

Thr Pro Ala Phe Pro Pro Gln Ala Gly Ala Leu Trp Asp Glu Ala Leu
145 150 155 160

Pro Ser Ala Pro Gly Cys Ile Ala Pro Gly Pro Leu Leu Asp Pro Pro
165 170 175

Met Lys Ala Val Pro Thr Val Ala Gly Ala Arg Phe Pro Leu Phe His
180 185 190

Phe Lys Pro Ser Pro Pro His Pro Pro Ala Pro Ser Pro Ala Gly Gly

195	200	205
His His Leu Gly Tyr Asp Pro Thr Ala Ala Ala Ala Leu Ser Leu Pro		
210	215	220
Leu Gly Ala Ala Ala Ala Ala Gly Ser Gln Ala Ala Ala Leu Glu Ser		
225	230	235 240
His Pro Tyr Gly Leu Pro Leu Ala Lys Arg Ala Ala Pro Leu Ala Phe		
245	250	255
Pro Pro Leu Gly Leu Thr Pro Ser Pro Thr Ala Ser Ser Leu Leu Gly		
260	265	270
Glu Ser Pro Ser Leu Pro Ser Pro Pro Ser Arg Ser Ser Ser Ser Gly		
275	280	285
Glu Gly Thr Cys Ala Val Cys Gly Asp Asn Ala Ala Cys Gln His Tyr		
290	295	300
Gly Val Arg Thr Cys Glu Gly Cys Lys Gly Phe Phe Lys Arg Thr Val		
305	310	315 320
Gln Lys Asn Ala Lys Tyr Val Cys Leu Ala Asn Lys Asn Cys Pro Val		
325	330	335
Asp Lys Arg Arg Arg Asn Arg Cys Gln Tyr Cys Arg Phe Gln Lys Cys		
340	345	350

Leu Ser Val Gly Met Val Lys Glu Val Val Arg Thr Asp Ser Leu Lys
355 360 365

Gly Arg Arg Gly Arg Leu Pro Ser Lys Pro Lys Ser Pro Leu Gln Gln
370 375 380

Glu Pro Ser Gln Pro Ser Pro Pro Ser Pro Pro Ile Cys Met Met Asn
385 390 395 400

Ala Leu Val Arg Ala Leu Thr Asp Ser Thr Pro Arg Asp Leu Asp Tyr
405 410 415

Ser Arg Tyr Cys Pro Thr Asp Gln Ala Ala Ala Gly Thr Asp Ala Glu
420 425 430

His Val Gln Gln Phe Tyr Asn Leu Leu Thr Ala Ser Ile Asp Val Ser
435 440 445

Arg Ser Trp Ala Glu Lys Ile Pro Gly Phe Thr Asp Leu Pro Lys Glu
450 455 460

Asp Gln Thr Leu Leu Ile Glu Ser Ala Phe Leu Glu Leu Phe Val Leu
465 470 475 480

Arg Leu Ser Ile Arg Ser Asn Thr Ala Glu Asp Lys Phe Val Phe Cys
485 490 495

Asn Gly Leu Val Leu His Arg Leu Gln Cys Leu Arg Gly Phe Gly Glu
500 505 510

Trp Leu Asp Ser Ile Lys Asp Phe Ser Leu Asn Leu Gln Ser Leu Asn
515 520 525

Leu Asp Ile Gln Ala Leu Ala Cys Leu Ser Ala Leu Ser Met Ile Thr
530 535 540

Glu Arg His Gly Leu Lys Glu Pro Lys Arg Val Glu Glu Leu Cys Asn
545 550 555 560

Lys Ile Thr Ser Ser Leu Lys Asp His Gln Ser Lys Gly Gln Ala Leu
565 570 575

Glu Pro Thr Glu Ser Lys Val Leu Gly Ala Leu Val Glu Leu Arg Lys
580 585 590

Ile Cys Thr Leu Gly Leu Gln Arg Ile Phe Tyr Leu Lys Leu Glu Asp
595 600 605

Leu Val Ser Pro Pro Ser Ile Ile Asp Lys Leu Phe Leu Asp Thr Leu
610 615 620

Pro Phe
625

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

gttttttttt tttttta

17

<210> 4

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

gttttttttt ttttttc

17

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

gttttttttt ttttttg

17

<210> 6

<211> 10

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

cattctcagg

10

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

tgccttgtct agaactgcac ag

22

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

aagtgtgttg gaccaagcag c

21

<210> 9

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Probe Sequence

<400> 9

aagtcagtgc agagcctgga tgagga

26

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

tcacccacac tgtgcccatc tacga

25

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 11

cagcggaacc gctcattgcc aatgg

25

<210> 12

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Probe Sequence

<220>

<221> misc_binding

<222> (1)

<223> Label FAM

<220>

<221> misc_binding

<222> (7)

<223> Label TAMRA

<400> 12

atgccctccc ccatgccatc ctgcgt

26

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 13

gttccaggca ataacatcat acc

23

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 14

gctacttgtg aaactcccaa atg

23

<210> 15

<211> 2087

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

ggcaaaaatc tgtactttta aaagtgccat tggatgattc tttggcacac taaggtttga 60

gaaccatcga tatagtttat aataacaact caattttacc ttgaattttc cagcttttcc 120

tggggttgag aagggatgag caatagagat ataaattttc ctgaaagcaa tcaattcatt 180

taacaaatac ttactgaatg gctgctaggt agtaggcact gttccagggc aatggacacg 240

ttgctgaaca agacaaagcc cttatccaca tgaaccttac atacctgtaa aggagaaaaa 300

gagtaaacia atatacaatt gcagtgatgt cattgggtggg aggagaggaa ttttttgctt 360

tttgcttttt ggagtggggg catagagtta gatcagaaaa gaaaaaattg gggggaaaaat 420

atattcattg ccaattttta aaatgtcact ttttaaagtg taagaaccta agaatatgta 480

tacatagttt gacttataca atgatcacat ctaaaatttt tagagctata gttgagaaaa 540

gtaacatttt aaggggagaa aaacgtgtcc ttagcgtagt ctacatattt agccagggtc 600

gaaagtgaga tagagtaaatt attagattcc actctgctat taaagcctca catcactaat 660

ttttgagggg tgggtgtttc catgggtctc acttaatttc cacacaaata tctcatttgg 720

ggcctgggct attgctgaag tctgacttgt atagctgcgt tactgccata tgaaacacac 780

agaccatttt tagtttacat aatatccatt gctgttgttt gcagctctag attcccattc 840

taggtgcttt agagaaacct tccttaggca ttggctgtca gtaaattgtaa tactgtgtct 900

ttgactagtg agaaagccag agttctgaca gatcaataac ccctataggg tggaaaaaaa 960

ttagtataaa caggaaaaaa gttcacttaa aaaaatcttt ttgcatttga cctatgttcg 1020

attggcatga tcagtaagca aatatttcta gattttcttt gtcaaaccce aaacctactt 1080

agcccagaga cagagcaatc aatgtagggc agcagagaca cagagctggg agtccagtcc 1140

ttccaactct aggaccagta ttcattgggt gaggttttcc taaactggta ggccaggcag 1200

agaaaaaatc taaaacgttt tgttccgttc ctttacatct tatgtccaat agaggagatt 1260

tttcttttcc tccagcattg gatgctgacc ctccagtcac cccaagtta ctggtggctc 1320

agactgaatt cactttggct ccaaaattct gagacttga ccaaaaccac tgcaggtgaa 1380

gccagagga tctggctgga gcctggcagg ctgggccggc tggctttcct tcttgctggg 1440

ctccatcaga gaaaagtaca cacacagggt gggcaggac ttcacttccc tgtgtgcaga 1500

aggcatgaaa tgtgagccca gcaggggcag aagcctgcag aggaccctgg gtgaaagcta 1560

cacacttga tggattctga acaaatattg gaagcagaga gattgttgag ttgtgagcca 1620

tggattcagg ggagtcagtg caggaggtag ctgtcagatc cattctcagg ggaaactatt 1680

cattctttag tctttttctc tctcccacta ttttaaaca aaataatgct gaatcagtgt 1740

caagttccag gcaataacat catacctggg gtgatttagc aatatttaga atcatttaat 1800

gcaagagcca gaagtaatct tagggatcag gtagtcact ttattcctgt tccagagact 1860

gaaactgact cagagagggtt aaatgccttg tctagaactg cacagcaagt cagtgcagag 1920

cctggatgag gaccccatga cctgctgctt ggtccaacac actttccttt actcccactc 1980

atttgggagt ttcacaagta gctccctcag cttttgaaag ggaggatctg ccctgaattt 2040

cattctgctc ttggagagcc tgtggaatta ttaaataaat tcataaa 2087

<210> 16

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 16

tgggtgccct ggtagaact 19

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 17

gcttcaggta gaagatgcgc t

21

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Probe Sequence

<400> 18

aggaagatct gcaccctggg cctc

24

【図面の簡単な説明】

【図 1】 アトピー性皮膚炎患者（患者番号 1 ～ 7）の、増悪期と寛解期における β アクチンにより補正した 2250-01 発現量（copy/ng RNA）を示す図である。

【図 2】 増悪期から寛解期に伴って好酸球数の減少する患者のみにおける、NOR-1 遺伝子の ORF 部位で測定した発現量を示す図である。

【図 3】 本発明者らによって構築された NOR-1 受容体のリガンド探索系を模式的に示す図である。X に NOR-1 の全長遺伝子またはリガンド結合部位、Y に retinoic acid X receptor (RXR) α の全長遺伝子を挿入する。これらを NIH3T3 細胞に遺伝子導入し、誘導されてくるルシフェラーゼの活性を測定する。

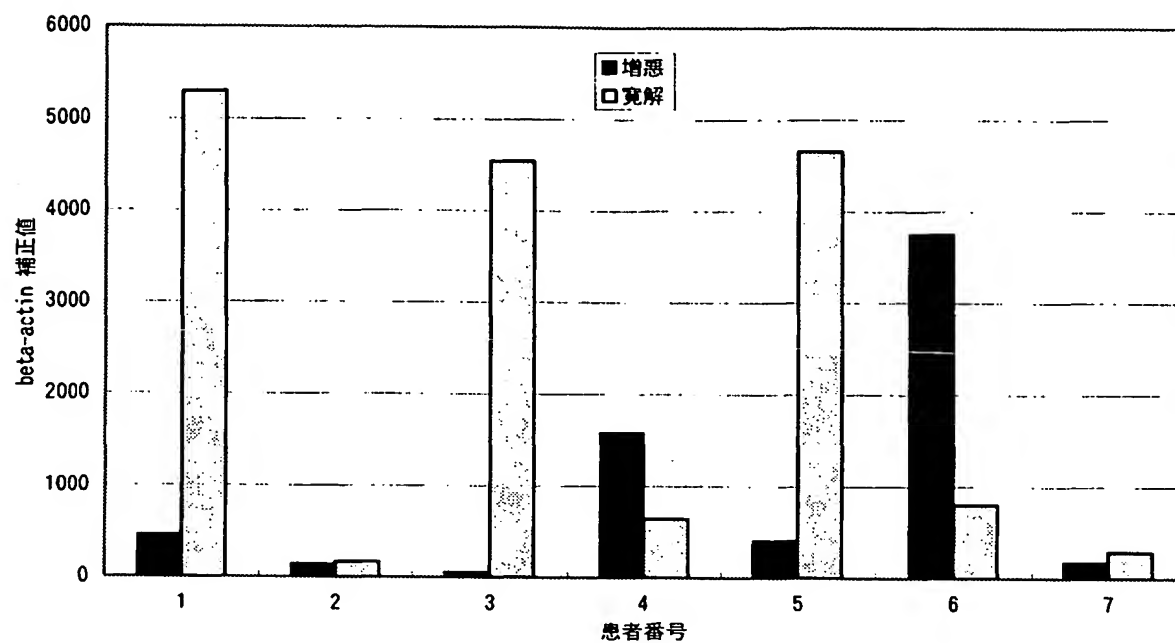
【図 4】 NOR-1 受容体タンパク質の構造を模式的に示す図である。

【図 5】 図 3 のシステムを用いたときの prostaglandin A₂ および prostagl

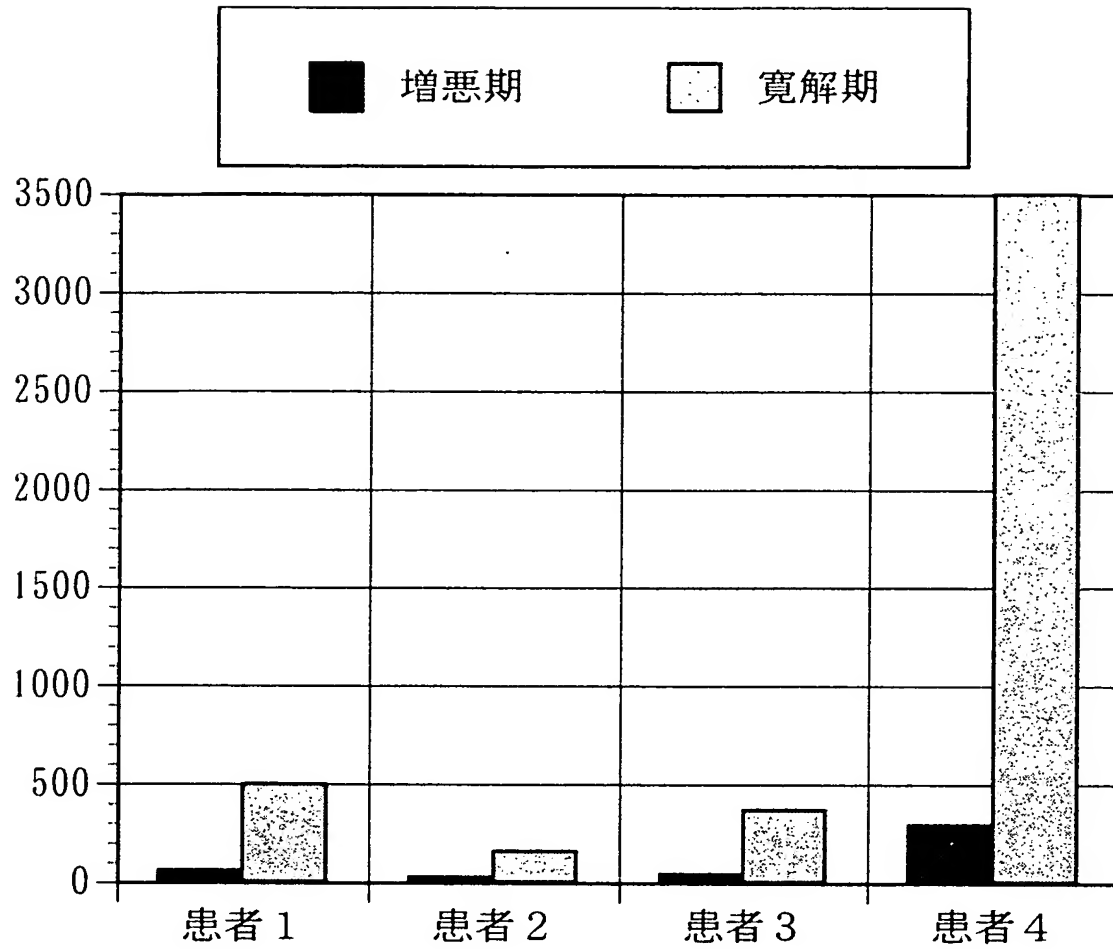
andin A₁のNOR-1転写活性化作用を示す図である。

【書類名】 図面

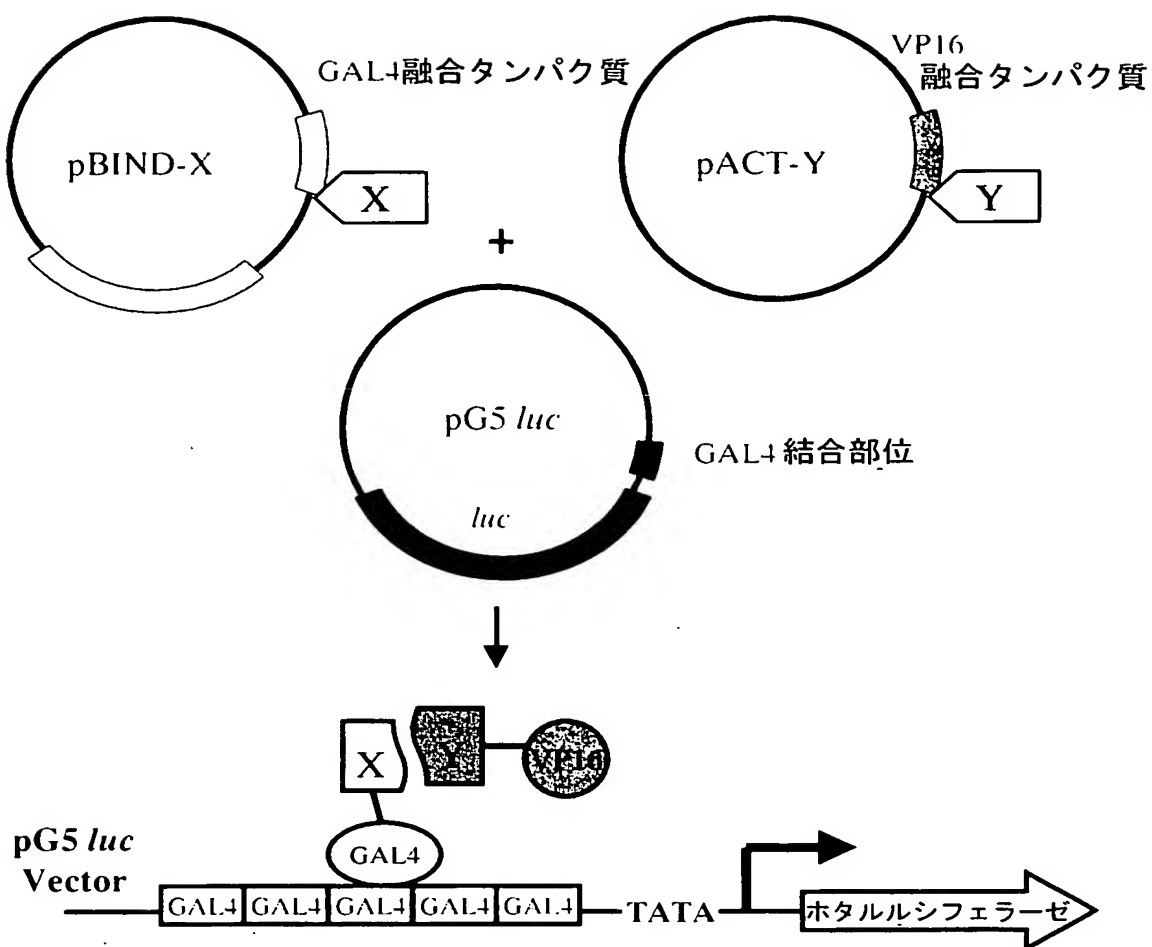
【図 1】



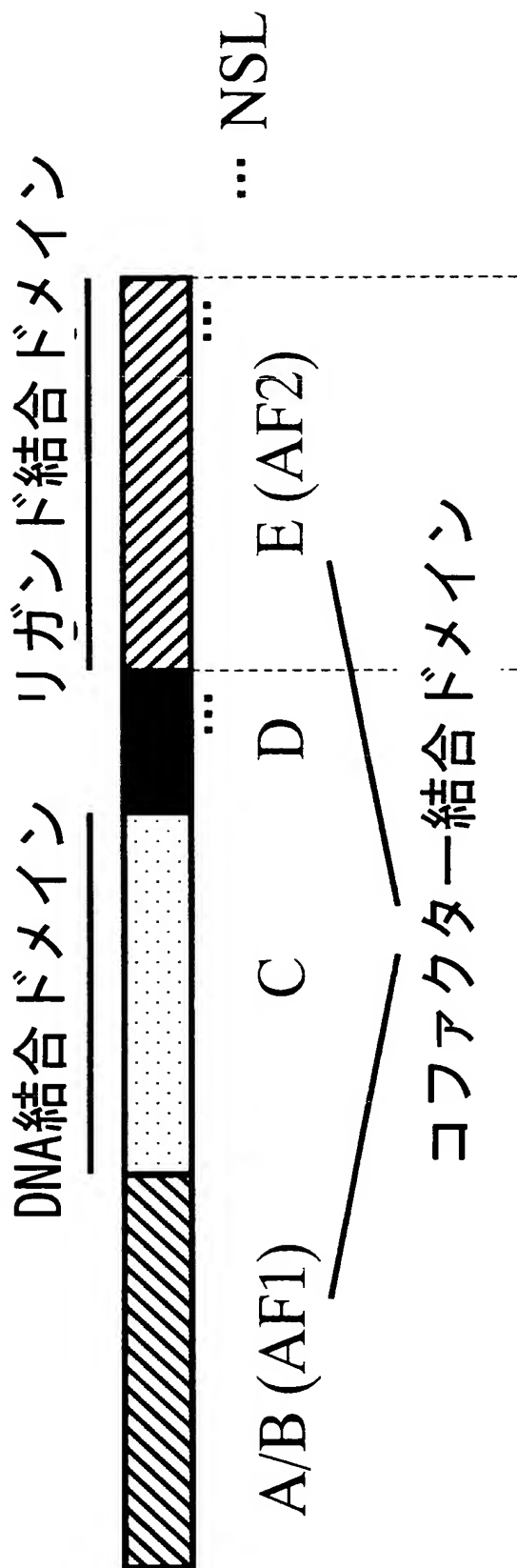
【図 2】



【図 3】

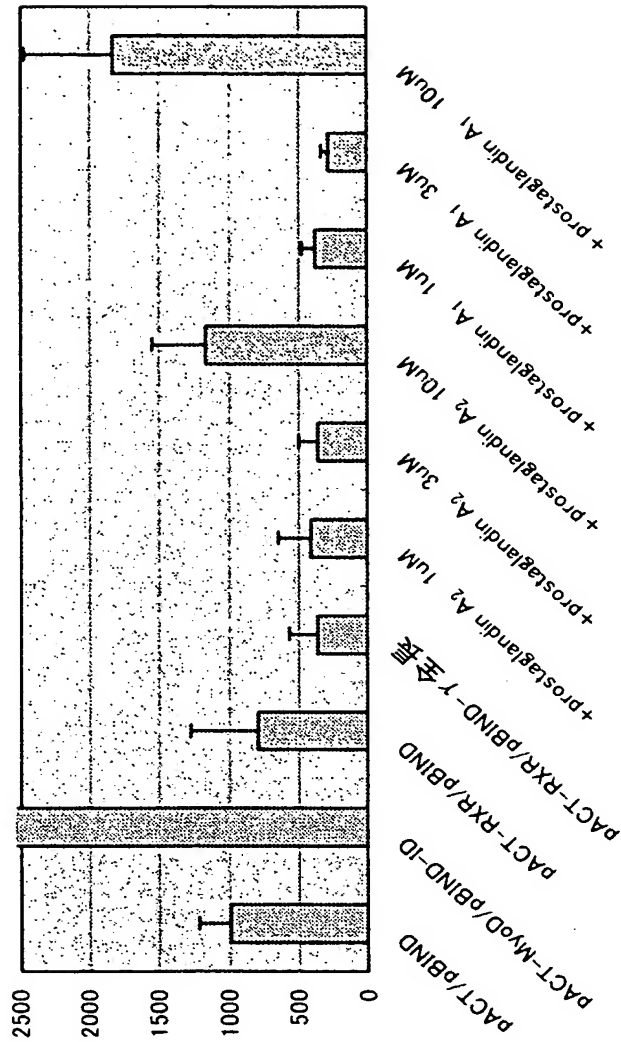


【図 4】



【図 5】

3T3 pACT-RXR/pBIND- γ 全長



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規なアレルギー性疾患の検査方法、およびアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法、並びにアレルギー性疾患の治療のための薬剤の提供を課題とする。

【解決手段】 ディファレンシャルディスプレイ法により、アトピー性皮膚炎患者の増悪期と寛解期に採取した好酸球において発現に差の見られる遺伝子を探索した。その結果、好酸球の減少を伴う寛解期にある患者の好酸球において、有意に発現が上昇しているNOR-1(MINOR)遺伝子を同定することに成功した。本発明者らは、該遺伝子をアレルギー性疾患の検査、および治療薬候補化合物のスクリーニングに使用できることを見出した。

【選択図】 なし

【書類名】 手続補正書
【整理番号】 G1-A0212
【提出日】 平成14年 7月 4日
【あて先】 特許庁長官殿
【事件の表示】
 【出願番号】 特願2002-188490
【補正をする者】
 【識別番号】 597177471
 【氏名又は名称】 株式会社ジェノックス創薬研究所
【代理人】
 【識別番号】 100102978
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 清水 初志

【手続補正 1】**【補正対象書類名】** 特許願**【補正対象項目名】** 特許出願人**【補正方法】** 変更**【補正の内容】****【特許出願人】****【識別番号】** 597177471**【氏名又は名称】** 株式会社ジェノックス創薬研究所**【特許出願人】****【識別番号】** 502196050**【氏名又は名称】** 国立成育医療センター総長

【その他】 本補正書で補正する理由は、特許出願人の住所を「東京都世田谷区大蔵 2 丁目 1 0 - 1」、名称を「国立成育医療センター総長」と記載すべきところを、誤って「東京都世田谷区太子堂 3 - 3 5 - 3 1」「国立成育医療センター」と記載してしまった為であります。

【プルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-188490
受付番号	50200978502
書類名	手続補正書
担当官	川崎 津夜子 1355
作成日	平成 14 年 7 月 10 日

< 認定情報・付加情報 >

【補正をする者】

【識別番号】 597177471

【住所又は居所】 茨城県つくば市東光台 5-1-3

【氏名又は名称】 株式会社ジェノックス創薬研究所

【代理人】 申請人

【識別番号】 100102978

【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6
階 清水国際特許事務所

【氏名又は名称】 清水 初志

次頁無

【書類名】 手続補正書

【整理番号】 G1-A0212

【提出日】 平成14年 7月29日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

【出願番号】 特願2002-188490

【補正をする者】

【識別番号】 597177471

【氏名又は名称】 株式会社ジェノックス創薬研究所

【補正をする者】

【識別番号】 502196050

【氏名又は名称】 国立成育医療センター総長

【代理人】

【識別番号】 100102978

【弁理士】

【氏名又は名称】 清水 初志

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 その他

【補正方法】 追加

【補正の内容】

【その他】 国以外の全ての者の持分の割合 0 5 0 / 1 0 0

【プルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-188490
受付番号	50201114555
書類名	手続補正書
担当官	川崎 津夜子 1355
作成日	平成 15 年 1 月 16 日

< 認定情報・付加情報 >

【補正をする者】

【識別番号】	597177471
【住所又は居所】	茨城県つくば市東光台 5-1-3
【氏名又は名称】	株式会社ジェノックス創薬研究所

【補正をする者】

【識別番号】	502196050
【住所又は居所】	東京都世田谷区大蔵 2 丁目 10-1
【氏名又は名称】	国立成育医療センター総長

【代理人】

【識別番号】	100102978
【住所又は居所】	茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 清水国際特許事務所
【氏名又は名称】	清水 初志

次頁無

【書類名】 手続補正書

【整理番号】 G1-A0212

【提出日】 平成14年11月29日

【あて先】 特許庁長官殿

【事件の表示】

 【出願番号】 特願2002-188490

【補正をする者】

 【識別番号】 597177471

 【氏名又は名称】 株式会社ジェノックス創薬研究所

【補正をする者】

 【識別番号】 502196050

 【氏名又は名称】 国立成育医療センター総長

【代理人】

 【識別番号】 100102978

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 清水 初志

【手続補正 1】

【補正対象書類名】 特許願

【補正対象項目名】 発明者

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区野川 9 0 7 帝京大学生物工学研究センター内 株式会社ジェノックス創薬研究所内

【氏名】 橋田 亮一

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区野川 9 0 7 帝京大学生物工学研究センター内 株式会社ジェノックス創薬研究所内

【氏名】 加賀谷 伸治

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区野川 9 0 7 帝京大学生物工学研究センター内 株式会社ジェノックス創薬研究所内

【氏名】 彌生 吉広

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県川崎市宮前区野川 9 0 7 帝京大学生物工学研究センター内 株式会社ジェノックス創薬研究所内

【氏名】 杉田 雄二

【発明者】

【住所又は居所】 東京都世田谷区太子堂 3 - 3 5 - 3 1 国立成育医療センター研究所内

【氏名】 斎藤 博久

【その他】 誤記の理由は、発明者を、「橋田亮一」「加賀谷伸治」「彌生吉広」「杉田雄二」「斎藤博久」の 5 名を記載すべきところを出願時に誤って「橋田亮一」「加賀谷伸治」「彌生吉広」「杉田雄二」「斎藤博久」「大倉永也」

と記載してしまった為であります。

【プルーフの要否】 要

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-188490
受付番号	50201810442
書類名	手続補正書
担当官	大竹 仁美 4128
作成日	平成 15 年 1 月 16 日

<認定情報・付加情報>

【補正をする者】

【識別番号】	597177471
【住所又は居所】	茨城県つくば市東光台 5-1-3
【氏名又は名称】	株式会社ジェノックス創薬研究所

【補正をする者】

【識別番号】	502196050
【住所又は居所】	東京都世田谷区大蔵 2 丁目 10-1
【氏名又は名称】	国立成育医療センター総長

【代理人】

【識別番号】	100102978
【住所又は居所】	茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 清水国際特許事務所
【氏名又は名称】	清水 初志

次頁無

特願 2 0 0 2 - 1 8 8 4 9 0

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 9 7 1 7 7 4 7 1]

1. 変更年月日

1 9 9 7 年 1 2 月 6 日

[変更理由]

新規登録

住 所

茨城県つくば市東光台 5 - 1 - 3

氏 名

株式会社ジェノックス創薬研究所

特願 2002-188490

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[502196050]

1. 変更年月日

2002年 5月31日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都世田谷区大蔵2丁目10-1

氏 名

国立成育医療センター総長